

Neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Philipp Theurer
geboren am 01.08.1982 in Ludwigsburg

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Thomas Deufel, Institut für klinische Chemie und
Laboratoriumsdiagnostik, Universitätsklinikum Jena**
- 2. Prof. Dr. Christian Hübner, Institut für Humangenetik,
Universitätsklinikum Jena**
- 3. PD Dr. Christoph Kaether, Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-
Lipmann-Institut e.V., Jena**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 5. April 2011

I. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BDNF	Engl.: <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BMP	Engl.: <i>Bone morphogenetic protein</i>
DMEM	Engl.: <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Engl.: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EC-Zellen	Engl.: <i>Embryonale carcinoma cells</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FACS	Engl.: <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Engl.: <i>Fetal calf serum</i>
FGF	Engl.: <i>Fibroblast growth factor</i>
GABA	Engl.: <i>Gamma aminobutyric acid</i>
GFAP	Engl.: <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
HBSS	Engl.: <i>Hank's buffered salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HWS	Halswirbelsäule
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LIF	Engl.: <i>Leukaemia inhibitory factor</i>
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MEF-Zellen	Engl.: <i>Mouse embryonal fibroblast cells</i>
MEM	Engl.: <i>Minimum essential medium</i>
NEAA	Engl.: <i>Non-essential amino acid solution</i>
NFL	Neurofilament
NGF	Engl.: <i>Nerve growth factor</i>
NT3	Engl.: <i>Neurotrophin 3</i>
PBS	Engl.: <i>Phosphate buffered saline</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PSA-NCAM	Engl.: <i>Polysialylated neural cell adhesion molecule</i>

SDS	Engl.: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SHH	Engl.: <i>Sonic hedgehog</i>
TBS	Engl.: <i>Tris buffered saline</i>
TBST	Engl.: <i>Tris buffered saline Tween 20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin

II. Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	3
II.	Inhaltsverzeichnis	5
1	Zusammenfassung.....	8
2	Einleitung	10
2.1	Stammzellen.....	10
2.1.1	Embryonale Stammzellen der Maus	11
2.1.1.1	Eigenschaften embryonaler Stammzellen.....	12
2.1.1.2	Bedeutung embryonaler Stammzellen	13
2.1.2	Adulte Stammzellen	14
2.2	Neuronale Differenzierung	15
2.2.1	Differenzierung in vivo.....	15
2.2.2	Einfluss von Retinsäure auf die Differenzierung.....	16
2.2.3	Differenzierung embryonaler Stammzellen in vitro	19
2.2.4	Kriterien der neuronalen Differenzierung	20
3	Ziel der Arbeit	23
4	Materialien und Methoden	24
4.1	Zellkultur.....	24
4.1.1	Allgemeine Methoden	24
4.1.1.1	Beschichtung der Zellkulturgefäße.....	24
4.1.1.2	Ablösen und Vereinzeln der Zellen	24
4.1.1.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen	25
4.1.2	Kultur embryonaler Mausfibroblasten.....	26
4.1.3	Kultur embryonaler Stammzellen	26
4.1.4	Trennung der embryonalen Stammzellen von den embryonalen Mausfibroblasten	28
4.1.5	Neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen.....	29
4.1.5.1	Suspensionskultur.....	29
4.1.5.2	Kultur im hängenden Tropfen.....	30
4.1.6	Ausplattierung der Embryoidkörperchen	32
4.1.7	Selektion neuronaler Vorläuferzellen	32
4.1.8	Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen in Neurone	33
4.1.8.1	Vorbereitung der Deckgläschen.....	33

4.1.8.2	Neuronenkultur ohne Gliazellen.....	34
4.1.8.3	Gliazell-Co-Kultur (Langzeitkultur)	35
4.1.8.4	Isolation und Kultur primärer hippocampaler Neurone.....	36
4.1.8.5	Isolation von Gliazellen	37
4.2	Immunzytologie	38
4.2.1	Antikörper.....	38
4.2.2	Fixierung	40
4.2.3	Antikörperfärbung.....	41
4.2.4	Auswertung am Mikroskop.....	41
4.3	Western Blot.....	42
4.3.1	Lyse der Zellen.....	42
4.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	42
4.3.3	Elektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970)	43
4.3.4	Transfer auf Nitrozellulosemembran	44
4.4	Statistische Auswertung	46
4.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	47
4.6	Chemikalien.....	48
5	Ergebnisse	51
5.1	Kultur embryonaler Stammzellen	51
5.2	Differenzierung embryonaler Stammzellen in Neurone	52
5.2.1	Bildung von Embryoidkörperchen	52
5.2.2	Gerichtete Differenzierung	54
5.2.2.1	Einfluss von Retinsäure auf die neuronale Differenzierung.....	54
5.2.2.2	Einfluss von fetalem Kälberserum auf die neuronale Differenzierung.....	56
5.3	Selektion neuronaler Vorläuferzellen.....	57
5.4	Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen	61
5.5	Immunzytologie	65
5.5.1.1	Immunzytologische Charakterisierung der Embryoidkörperchen .	65
5.5.1.2	Immunzytologische Charakterisierung der Zellen mit neuronenähnlicher Morphologie.....	68
6	Diskussion	72
6.1	Kultur embryonaler Stammzellen	72
6.2	Neuronale Differenzierung	74

6.2.1	Bildung der Embryoidkörperchen	74
6.2.2	Einfluss von Retinsäure auf die neuronale Differenzierung.....	75
6.2.3	Einfluss von fetalem Kälberserum auf die neuronale Differenzierung .	76
6.2.4	Selektion neuronaler Zellen.....	78
6.2.5	Kultur der Neurone aus embryonalen Stammzellen.....	80
6.2.6	Charakterisierung der Neurone aus embryonalen Stammzellen	82
6.2.7	Grenzen der Methode	84
7	Schlussfolgerung und Ausblick.....	87
III.	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	89
IV.	Kurzform des etablierten Protokolls.....	103
V.	Danksagung.....	105
VI.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	106
VII.	Lebenslauf	107

1 Zusammenfassung

Embryonale Stammzellen differenzieren ohne besondere Kulturbedingungen spontan und zufällig in Körperzellen aller drei Keimblätter. Die gemeinsamen neuronalen und glialen Vorläuferzellen, aus denen reife Neurone hervorgehen, stellen dabei nur einen verhältnismäßig kleinen Teil der Gesamtzellpopulation dar. Es ist jedoch bekannt, dass durch eine gezielte Zugabe von Retinsäure die Differenzierung embryonaler Stammzellen in neuronale Zellen induziert werden kann. Hierfür existieren bereits mehrere Protokolle. Ziel der Arbeit war die Etablierung eines solchen Protokolls für die gerichtete in-vitro-Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus vor Ort im institutseigenen Labor. Die embryonalen Stammzellen der Maus (R1-Klon) wurden zunächst im undifferenzierten Zustand unter Zugabe des Wachstumsfaktors *leukaemia inhibitory factor* (LIF) vermehrt. Anschließend erfolgte eine zweitägige Kultur in Suspension oder in hängenden Tropfen mit einem serum- und retinsäurehaltigen Nährmedium. In dieser Zeit erfolgte die Bildung der Embryoidkörperchen als Zeichen der beginnenden Differenzierung. Nach weiteren 6 Tagen Kultur ohne Retinsäure wurden die Embryoidkörperchen auf adhäsiven Zellkulturschalen ausplattiert. Um den Anteil der neuronalen Vorläuferzellen zu erhöhen, folgte ein Selektionsschritt mit einem Insulin, Transferrin und Selenit enthaltenden Selektionsmedium über 9 Tage. Die Induktion der neuronalen Differenzierung wurde durch Bestimmung der Konzentration von Nestin, einem Markerprotein neuronaler Vorläuferzellen, mittels Western Blot quantifiziert. Es zeigte sich dabei eine Abhängigkeit von der Retinsäurekonzentration und dem Anteil an fetalem Kälberserum während der Differenzierung. Bei Verwendung von Retinsäure in einer Konzentration von 5×10^{-7} mol/l und einem Anteil an fetalem Kälberserum von 5% wurde die maximale Nestinkonzentration in den Embryoidkörperchen beobachtet. Die aus den neuronalen Vorläuferzellen differenzierten Neurone zeigten während der sich anschließenden Neuronenkultur eine charakteristische Morphologie mit typischen Zellausläufern. Zusätzlich konnten die neuronenspezifischen Markerproteine β 3-Tubulin, Neurofilament 68 und 200 kD, Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 und Synaptophysin immunzytologisch nachgewiesen werden. Eine vollständige Reinheit der Neurone wurde jedoch trotz Anwendung des Selektionsmediums nicht erreicht. Um diesem Ziel näher zu

kommen, sind weitere Schritte in Erwägung zu ziehen, die unter dem Begriff Zelllinienselektion zusammengefasst werden können. Hierbei werden Zellen eines exakt definierten Phänotyps, in diesem Fall Neurone, beispielsweise anhand neuronenspezifischer Markerproteine mit immunologischen Methoden wie fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) oder Immunopanning angereichert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Protokoll zur gerichteten Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus in Neurone mit Hilfe von Retinsäure etabliert werden. Mit dieser in-vitro-Differenzierung von Neuronen steht nun ein Instrument bereit, das auch dann die Untersuchung von Neuronen ermöglicht, wenn aus den ES-Zellen beispielsweise aufgrund einer genetischen Veränderung keine lebensfähigen Tiere für die Isolation von Primärneuronen erzeugt werden können. Auch bei Krankheiten des Nervensystems, die durch sehr heterogene genetische Veränderungen hervorgerufen werden, kann die aufwändige Erzeugung der entsprechend zahlreichen Versuchstiere mit den verschiedenen Veränderungen umgangen werden, indem die zu untersuchenden Neurone direkt aus den ES-Zellen mit den jeweiligen genetischen Veränderungen gewonnen werden.

2 Einleitung

2.1 Stammzellen

Stammzellen sind allgemein Körperzellen, die sich in verschiedene Zelltypen oder Gewebe ausdifferenzieren können. Es handelt sich um undifferenzierte Zellen, die sich einerseits durch Zellteilung selbst erneuern und andererseits weiter differenzierte Vorläuferzellen beziehungsweise vollständig ausdifferenzierte funktionstüchtige Zellen hervorbringen können. In Abhängigkeit vom Differenzierungspotential werden unter den Stammzellen totipotente, pluripotente, multipotente, oligopotente und unipotente Stammzellen unterschieden (Wagers und Weissman 2004). Totipotente Zellen besitzen das uneingeschränkte Potential sowohl in embryonale als auch in extraembryonale Gewebe (Trophoblast) zu differenzieren. Zu den totipotenten Zellen gehört typischerweise die befruchtete und sich teilende Eizelle (Zygote) bis hin zum 8-Zell-Stadium (Blastomere). Mit dem Übergang in das 16-Zellstadium (Morula) und der Differenzierung in die innere Zellmasse und den Trophoblasten verlieren diese Zellen ihre Totipotenz. Den Zellen aus der inneren Zellmasse fehlt die Fähigkeit, den extraembryonalen Trophoblasten zu bilden. Sie sind lediglich pluripotent und können nur an der Bildung der embryonalen Gewebe aller drei Keimblätter teilhaben, ohne dass daraus ein kompletter Organismus hervorgehen kann. Aus dieser inneren Zellmasse werden die pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) isoliert, aus denen ebenfalls Zellen aller drei embryonalen Keimblätter hervorgehen können. Kommt es zu einer weiteren Einschränkung des Differenzierungsvermögens dieser Zellen, so spricht man zunächst von multipotenten und später von oligopotenten Stammzellen, die die Vorläuferzellen für eine abgrenzbare Untergruppe von Körperzellen darstellen. Abschließend erhält man die unipotente Stammzelle, die die Vorläuferzelle einer einzigen Zellart darstellt (Rohdewohld und Wobus 2002, Wagers und Weissman 2004)

2.1.1 Embryonale Stammzellen der Maus

Vor der erstmaligen Isolierung von ES-Zellen der Maus wurden für Differenzierungsexperimente die *Embryonal Carcinoma Cells* (EC-Zellen) verwendet (Finch und Ephrussi 1967). Es handelt sich um Zellen, die aus Teratokarzinomen isoliert werden können. Teratokarzinome treten spontan auf oder können durch Transplantation von Blastozysten in extrauterines Gewebe erzeugt werden (Abbildung 2-1; Solter et al. 1970). Im Gegensatz zu den benignen Teratomen besitzen die malignen Teratokarzinome neben ausdifferenziertem Körpergewebe aller drei Keimblätter auch undifferenzierte Tumorstammzellen (EC-Zellen). Im Laufe der 1970er-Jahre wurden mehrere EC-Zellklone in vitro etabliert, die sich unter jeweils unterschiedlichen Bedingungen im undifferenzierten Zustand vermehren oder zur Ausdifferenzierung in Zellen aller Keimblätter bringen ließen (Andrews 2002, Chambers und Smith 2004). Ein entscheidender Nachteil der EC-Zellen und deren Derivate sind jedoch die häufig abnormen Chromosomensätze, die den Differenzierungsvorgang beeinträchtigen können (Swartzendruber et al. 1976).

Aufgrund dieser Einschränkungen stellte sich die Frage, ob es nicht möglich wäre, undifferenzierte pluripotente ES-Zellen auch direkt aus der Blastozyste zu isolieren. Ein solches Verfahren wurde erstmals 1981 für das Mausmodell beschrieben. Damals gelang es, mit Hilfe bestimmter Kulturverfahren isolierte Blastozysten der Maus in die Zellkultur zu überführen (Evans und Kaufman 1981, Martin 1981). Hier wuchsen die Zellen der inneren Zellmasse als undifferenzierte ES-Zellen aus (Abbildung 2-1). Im Gegensatz zu den EC-Zellen wiesen die ES-Zellen auch nach mehreren hundert Zellteilungen normale diploide Karyotypen ohne chromosomale Veränderungen auf (Evans und Kaufman 1981, Martin 1981). Die Pluripotenz konnte experimentell durch Injektion der ES-Zellen in Empfängerblastozysten bestätigt werden. Nach anschließender Transplantation der Blastozysten in die Ovidukte weiblicher Mäuse konnte gezeigt werden, dass aus ES-Zellen Vorläuferzellen und funktionstüchtige spezialisierte Zellen aller drei Keimblätter entstehen können. Bei den entstandenen Tieren handelte es sich um Chimäre, deren Zellen aus den Zellen der Ursprungsblastozyste und der injizierten ES-Zellen hervorgegangen sind (Evans und Kaufman 1981, Martin 1981). Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnten pluripotente ES-Zellen nicht nur von der Maus, sondern auch von anderen Säugern,

wie zum Beispiel Affen und Menschen, isoliert und kultiviert werden (Evans und Kaufman 1981, Thomson et al. 1995, Thomson et al. 1998).

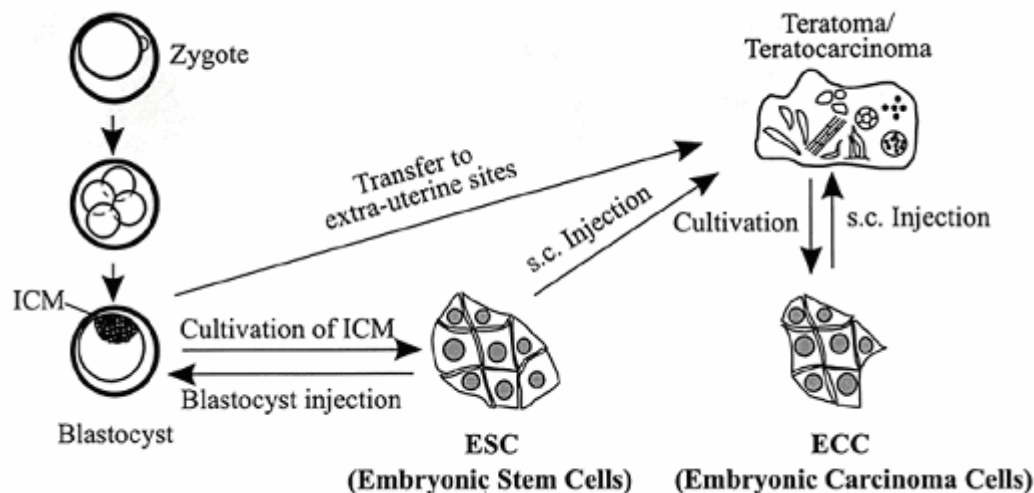


Abbildung 2-1: modifiziert aus Rohwedel et al. 1999. Aus der Zygote entwickelt sich die Blastozyste mit der inneren Zellmasse (ICM). Aus der Inneren Zellmasse lassen sich die embryonalen Stammzellen (ESC) isolieren. Durch Transplantation der kompletten Blastozyste beziehungsweise einzelner embryonaler Stammzellen (ESC) in extrauterines Gewebe erhält man ein Teratom beziehungsweise ein Teratokarzinom, aus dem sich die EC-Zellen (ECC) kultivieren lassen.

2.1.1.1 Eigenschaften embryonaler Stammzellen

ES-Zellen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie sich unter bestimmten Bedingungen im undifferenzierten Zustand in vitro kultivieren lassen und sich selbst erneuern können. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein eines Signalmoleküls, das eine spontane Ausdifferenzierung der ES-Zellen verhindert. Der Wachstumsfaktor *leukaemia inhibitory factor* (LIF) konnte als entscheidende Substanz dafür identifiziert werden. LIF ist ein Zytokin, das zur Interleukin 6-Familie gehört. Es wurde ursprünglich als Induktor der Differenzierung von Leukämiezellen entdeckt und später zur Inhibition der Differenzierung von ES-Zellen verwendet (Tomida et al. 1984, Williams et al. 1988, Niwa 2001). Die genaue Wirkungsweise von LIF ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht lückenlos aufgeklärt. Als sicher gilt jedoch, dass LIF über einen heterodimeren LIF-Rezeptor eine Signaltransduktionskaskade von *Janus-associated tyrosin kinases* (JAKs) und *signal*

transducers and activators of transkription (STATs) aktiviert, die die Ausdifferenzierung der Stammzellen in Anwesenheit von Serum verhindert (Matsuda et al. 1999, Liu et al. 2007). Die Zugabe von LIF erfolgt entweder exogen oder durch Co-Kultur mit LIF sezernierenden embryonalen Mausfibroblasten (MEF-Zellen; Smith et al. 1988).

2.1.1.2 Bedeutung embryonaler Stammzellen

Mit der Anwendung der „*gene targeting*“-Technik konnten die ES-Zellen der Maus als wichtiges Instrument für die Untersuchung von Genfunktionen und Gendefekten etabliert werden. Es ist inzwischen möglich, durch homologe Rekombination fremde DNA in ES-Zellen einzuschleusen und bestimmte Gene zu inaktivieren (Thomas und Capecchi 1987). Alternativ zu diesem Weg kann durch zufällige Insertion fremde DNA in Form von Gene-Trap-Vektoren in das Genom der ES-Zellen eingebracht und somit bestimmte Gene inaktiviert werden (Friedrich und Soriano 1991). Durch Injektion der veränderten ES-Zellen in die innere Zellmasse einer Empfängerblastozyste werden diese mit in die Embryonalentwicklung einbezogen, wodurch die Übertragung der genetischen Veränderung in die Keimbahn ermöglicht wird (Bradley et al. 1984, Friedrich und Soriano 1991). Bei den daraus resultierenden Mäusen handelt es sich um transgene Mäuse, deren Organe aus Abkömmlingen der veränderten ES-Zellen bestehen. Die Auswirkungen der genetischen Veränderungen lassen sich somit am Tiermodell untersuchen. Der Phänotyp der Mäuse kann indirekt auf die Funktion des fehlenden Gens hinweisen. In bestimmten Fällen führt eine Geninaktivierung jedoch zu so starken Beeinträchtigungen der Embryonalentwicklung, so dass keine lebensfähigen Tiere entstehen. In diesen Fällen bieten ES-Zellen die Möglichkeit, das Problem der frühen Letalität zu umgehen und den Gendefekt auf zellulärer Ebene *in vitro* zu untersuchen. Beispielsweise führte eine Mutation im Gen, das das Protein $\beta 1$ -Integrin kodiert, zum Absterben des Embryos kurz nach der Implantation (Fassler und Meyer 1995). Dennoch konnte durch eine *in-vitro*-Differenzierung der Stammzellen in Herz-, Skelettmuskel- und Nervenzellen der Einfluss dieses Gendefektes auf die Entwicklung dieser Zellen untersucht werden (Fassler et al. 1996, Rohwedel et al. 1998).

Neben der Bedeutung als Instrument zur Erforschung von Genfunktionen und Differenzierungsvorgängen stellen ES-Zellen eine wichtige Grundlage für die Entwicklung neuer Therapien, beispielsweise einer Zellersatztherapie dar. Durch die nahezu unbegrenzten Möglichkeiten der Expansion von ES-Zellen im undifferenzierten Zustand in Verbindung mit einer darauf folgenden Differenzierung in die gewünschten Körperzellen steht für diesen Zweck ein unerschöpfliches Reservoir an Zellen zur Verfügung. In den letzten Jahren konnten am Mausmodell zukunftsweisende Erfolge erzielt werden. Bereits 1996 wurden aus ES-Zellen differenzierte Herzmuskelzellen in die Herzkammer von Mäusen transplantiert. Die Zellen integrierten sich erfolgreich in das ortständige Gewebe und waren mehrere Wochen nachweisbar (Klug et al. 1996). Weiterhin konnten aus ES-Zellen erfolgreich Vorläuferzellen dopaminerger Neurone angereichert und in Mäusehirne transplantiert werden. Die Symptomatik einer Parkinsonerkrankung der Mäuse wurde damit reduziert (Kim et al. 2002). Eine Zellersatztherapie könnte somit die bisherigen Hindernisse bei der Heilung degenerativer Erkrankungen und anderer Gewebsschäden, beispielsweise durch Traumata und Ischämien, überwinden (Mimeault et al. 2007).

2.1.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich in den Organen eines erwachsenen Organismus finden lassen. Sie werden aus diesem Grund auch Gewebstammzellen genannt und konnten bereits aus zahlreichen Geweben, darunter Knochenmark, Keimdrüsen und Organe des Gastrointestinaltraktes, isoliert werden (Mimeault et al. 2007). Sogar in Organen wie Herz und Gehirn, die lange Zeit als „postmitotisch“ betrachtet wurden, konnten ein Zellumsatz nachgewiesen und entsprechende gewebsspezifische Stammzellen gefunden werden. Im Falle des Gehirns handelt es sich um gemeinsame Vorläuferzellen der Neurone und Gliazellen (Eriksson et al. 1998, Beltrami et al. 2003). Eine symmetrische Teilung dieser Stammzellen führt dabei zu ihrer eigenen Expansion im undifferenzierten Zustand, während durch asymmetrische Teilung jeweils eine neue Stammzelle und eine weiter differenzierte Vorläuferzelle einer bestimmten Zellart entsteht (Kindler 2005). Adulte

Stammzellen und die aus ihnen hervorgehenden Vorläuferzellen der spezifischen Gewebezellen dienen der Gewebserneuerung nach Zelluntergang oder der alleinigen Aufrechterhaltung der Gewebshomeostase (Spangrude et al. 1988, Beltrami et al. 2003, Wagers und Weissman 2004). Als Zeichen ihres Stammzellstatus lassen sich die adulten Stammzellen nach Isolation ähnlich wie die ES-Zellen im undifferenzierten Zustand in vitro vermehren. Die Kulturbedingungen variieren jedoch stark in Abhängigkeit vom Gewebe, aus dem sie isoliert wurden. Ebenso herrschen starke Unterschiede in der Geschwindigkeit der Zellvermehrung und der Ausdifferenzierung (Hombach-Klonisch et al. 2008).

2.2 Neuronale Differenzierung

2.2.1 Differenzierung in vivo

Die Ausgangssituation für die Entstehung des Nervensystems in vivo ist das Vorhandensein der drei embryonalen Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm. In einem als Neurulation bezeichneten Prozess grenzt sich aus dem Ektoderm das Neuroektoderm ab, das zuerst als Neuralplatte sichtbar wird. Induziert wird dieser Vorgang durch das benachbarte Mesoderm und Endoderm. Im weiteren Verlauf bildet sich aus der Neuralplatte die Neuralrinne, die sich dann zum Neuralrohr verschließt. Aus den Zellen dieses Neuralrohrs entwickelt sich im Laufe der Ontogenese schließlich das gesamte zentrale und periphere Nervensystem (Wilson und Edlund 2001, Du und Zhang 2004). Diese Zellen sind die gemeinsamen neuronalen und glialen Vorläuferzellen. Aus ihnen entwickeln sich die unipotenten glialen beziehungsweise neuronalen Vorläuferzellen, aus denen schließlich die ausdifferenzierten reifen Zellen hervorgehen. An der Regulierung der Embryogenese und der Entstehung des Nervensystems sind zahlreiche Signalmoleküle beteiligt, die noch nicht vollständig erforscht sind und deren jeweilige Bedeutung teilweise umstritten ist (Wilson et al. 2000, Wilson et al. 2001, Bertrand et al. 2003, Du und Zhang 2004).

2.2.2 Einfluss von Retinsäure auf die Differenzierung

Eine wesentliche Bedeutung bei der neuronalen Differenzierung in vivo wird der Retinsäure zugeschrieben. Retinsäure ist ein Metabolit des Vitamin A Stoffwechsels und wurde als eine der biologisch aktiven Formen des Vitamin A bei Differenzierungsvorgängen identifiziert (Williams und Napoli 1985). Vitamin A (Retinol), das selbst nur eine sehr geringe biologische Aktivität aufweist, wird durch enzymatisch katalysierte Oxidationsschritte in die aktiven Isoformen all-trans-Retinsäure und 9-cis-Retinsäure überführt (Williams und Napoli 1985, Chen et al. 1995, Duester 2000). Schon seit Anfang des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass Vitamin A ein essentieller Nahrungsbestandteil ist und eine wichtige Rolle im Sehvorgang spielt. In den Fünfzigerjahren des letzten Jahrhunderts beobachtete man, dass an trächtigen Säugetieren Vitamin-A-Entzug in schweren embryonalen Missbildungen resultierte (Cohlan 1953). Allerdings führte auch ein Überschuss an Vitamin A zu Missbildungen, von denen auch Derivate des Neuralrohres betroffen waren (Langman und Welch 1966, Maden 2002). Nach Entdeckung des Zusammenhangs zwischen Retinsäure und Vitamin A konnten durch Verabreichung von Retinsäure embryonale Missbildungen induziert werden. Diese betrafen unter anderem Derivate des Neuralrohres und ähnelten teilweise denen des Vitamin A Überschusses. Die Art der Missbildung hing wesentlich vom Zeitpunkt und der Dauer der Exposition mit exogen zugeführter Retinsäure im Embryonalstadium ab (Kochhar 1973, Kessel und Gruss 1991). Es wurde beobachtet, dass exogene Zugabe von Retinsäure in einem bestimmten Zeitraum der Embryonalentwicklung von Mäusen in reproduzierbarer Weise die Bildung des Neuralrohres beeinflusst und zu einer Spina bifida führt (Tibbles und Wiley 1988). Darüber hinaus besitzt exogen zugegebene Retinsäure die Fähigkeit, die Bildung von zusätzlichen ektopen Neuralrohren zu induzieren (Shum et al. 1999). Retinsäure kann also das embryonale Wachstum und insbesondere die Entwicklung neuronalen Gewebes in vivo beeinflussen.

Auf molekularer Ebene betrachtet, bindet Retinsäure an die zellulären retinsäurebindenden Proteine CRABP und CRBP, die wiederum mit den eigentlichen im Zellkern gelegenen Retinsäurerezeptoren RAR und RXR interagieren. All-trans-Retinsäure bindet dabei an den RAR-Rezeptor, während 9-cis-Retinsäure an den RXR- und RAR-Rezeptor bindet. Ihre eigentliche Funktion als ligandengesteuerter

Transkriptionsfaktor gewinnen die Rezeptoren durch Dimerisierung. Es bilden sich RXR-Homodimere und RAR/RXR-Heterodimere, die an spezifische auf der DNA gelegene Bindungsstellen (*RA-response-elements*) binden und die Transkription der entsprechenden Zielgene regulieren (Abbildung 2-2; Rohwedel et al. 1999, Maden 2002).

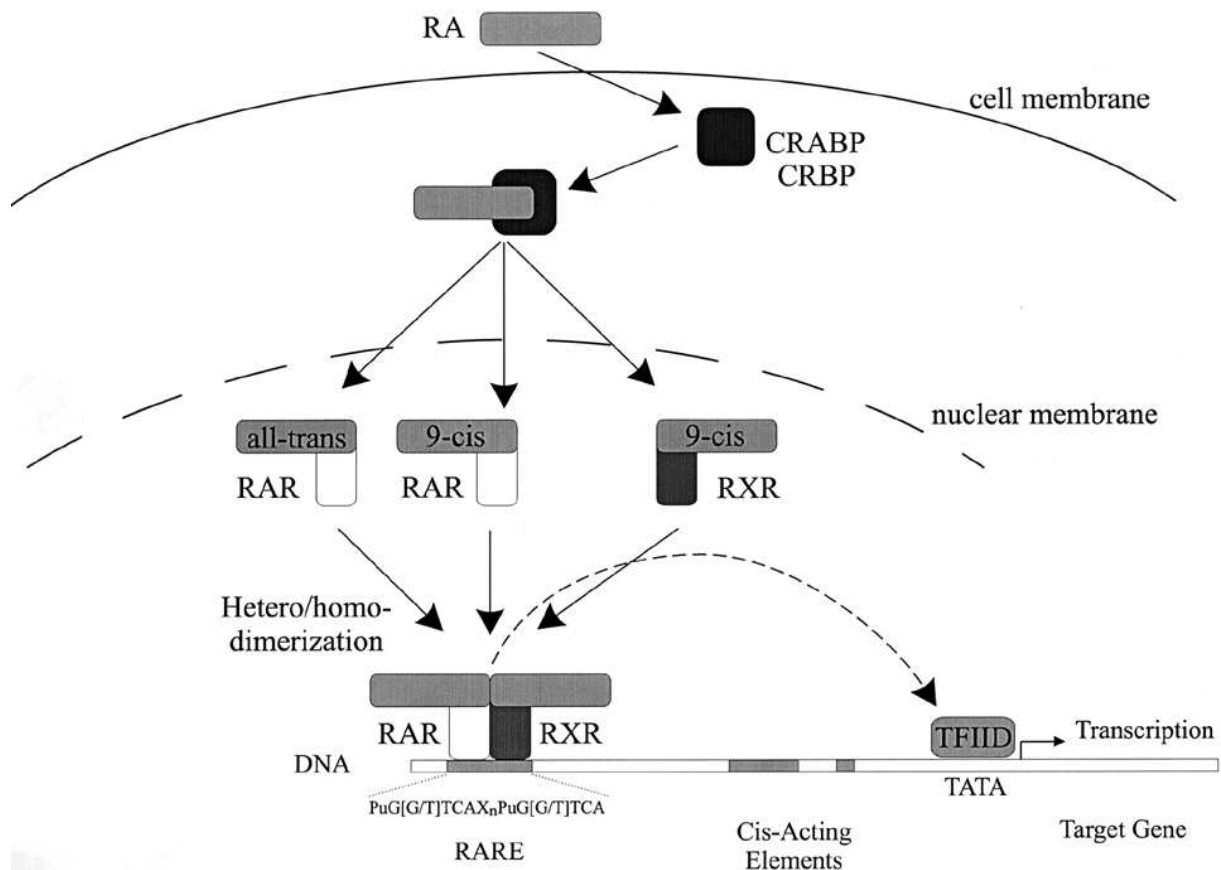


Abbildung 2-2: aus Rohwedel et al. 1999. Biochemischer Mechanismus der Retinsäurewirkung. Nach Bindung an die zellulären Transportproteine CRABP/CRBP gelangt Retinsäure zu den intranukleären Retinsäurerezeptoren, wobei all-trans-Retinsäure an den RAR-Rezeptor und 9-cis-Retinsäure an die RAR- und RXR-Rezeptoren bindet. Nach der Bildung von RAR/RXR-Heterodimeren beziehungsweise RXR/RXR-Homodimeren binden die Retinsäurerezeptoren an die entsprechenden DNA-Bindungsstellen (RARE, *retinoic acid response elements*) und regulieren die Transkription der untergeordneten Gene.

Zu den durch die Zugabe von Retinsäure beeinflussten Zielgenen gehören die sogenannten HOX-Gene. In diesen wurden Bindungsstellen (*RA-response-elements*) für heterodimere RXR/RAR-Retinsäurerezeptoren nachgewiesen, die die Regulation der Expression durch Retinsäure ermöglichen (Langston und Gudas 1992, Popperl

und Featherstone 1993). Es handelt sich um eine Gruppe homologer Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren und damit wiederum die Aktivität nachgeschalteter Gene kontrollieren können. Genkomplexe dieser Art wurden ursprünglich im Genom der Drosophila-Fliege identifiziert und waren dort für homöotische Missbildungen verantwortlich, bei denen eine Körperstruktur in eine andere Struktur umgewandelt wird, die eigentlich weiter hinten oder weiter vorne entlang der Körperachse lokalisiert ist (Scott und Weiner 1984, Kessel und Gruss 1991). Die HOX-Gene liegen auf der DNA in Gruppen lokalisiert und werden während der Embryogenese in Abhängigkeit von der Höhe entlang der Körperachse (Dollé et al. 1989) und in einer bestimmten zeitlichen Reihenfolge (Izpisua-Belmonte et al. 1991) aktiviert. 3'-lokalisierte Gene werden dabei früher und in weiter anterior gelegenen Regionen exprimiert, während 5'-lokalisierte Gene später und weiter posterior exprimiert werden. Für die Expression der 3'-lokalisierten HOX-Gene ist dabei eine geringere Retinsäurekonzentration nötig als für die 5'-lokalisierten Gene (Papalopulu et al. 1991). Dies führte zu der Annahme, dass Retinsäure einen Konzentrationsgradienten entlang der embryonalen Längsachse bildet und auf diese Weise an der Ausbildung der Körperachse und der Ausrichtung der Körperteile zueinander beteiligt ist (McCaffery und Drager 1994). Dadurch wiederum sind entlang der Körperachse immer unterschiedliche HOX-Gene aktiv, die die Körperregionen „markieren“ und die Organentwicklung inklusive des Zentralnervensystems in ihrer richtigen Position regulieren (Kessel und Gruss 1991, Krumlauf 1994).

Nicht nur bei den Vorgängen in vivo, sondern auch bei der Differenzierung von Stammzellen in vitro wurden Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle nachgewiesen, die durch Retinsäure beeinflusst werden und deren Wirkung vermitteln. Auch hier konnte eine durch Retinsäure regulierte Beeinflussung der HOX-Gene nachgewiesen werden (Mavilio et al. 1988, Boncinelli et al. 1991, Maden 2001, Lu et al. 2009).

2.2.3 Differenzierung embryonaler Stammzellen in vitro

Durch den Entzug von LIF erfolgt die spontane Ausdifferenzierung der ES-Zellen. Hierbei handelt es sich um einen stochastischen Prozess (Stanworth und Newland 2001, Du und Zhang 2004), der zu einem Gemisch von Körperzellen aller drei Keimblätter führt. Neuronale Vorläuferzellen beziehungsweise Neurone stellen dabei nur einen kleinen Teil der Zellpopulation dar.

Durch Verwendung bestimmter Medien, Wachstumsfaktoren und Oberflächenbeschichtungen kann die Richtung der Zelldifferenzierung in vitro beeinflusst werden (Brüstle et al. 1999). 1982 wurde unter Verwendung pluripotenter EC-Zellen der Maus erstmals beobachtet, dass Retinsäure gezielt die neuronale Differenzierung induziert, wenn sie in einem bestimmten Zeitraum und in einer bestimmten Konzentration während der Differenzierung zugegeben wird (Jones-Villeneuve et al. 1982). Es handelt sich bei diesem Vorgang um eine gerichtete Differenzierung, wobei die Differenzierung in Richtung der neuronalen Zellen gelenkt wird. Diese Beobachtungen bei der Anwendung von Retinsäure ließen sich auch auf ES-Zellen übertragen, so dass seit Mitte der 1990er Jahre mehrere Protokolle zur neuronalen Differenzierung von ES-Zellen in vitro beschrieben wurden (Strubing et al. 1995, Fraichard et al. 1995, Strubing et al. 1995, Wobus et al. 1997). Neben der neuronalen Differenzierung kann durch Retinsäure auch die Differenzierung in andere Gewebe, wie z.B. glatte Muskelzellen, Herzmuskelzellen und Fettzellen, induziert werden. Entscheidend für die gerichtete Differenzierung unter Retinsäure ist der Zeitpunkt der Zugabe und die Konzentration der Retinsäure (Abbildung 2-3; Dani et al. 1997, Drab et al. 1997, Rohwedel et al. 1999).

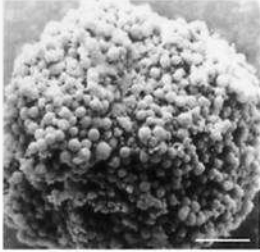
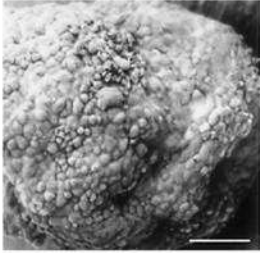
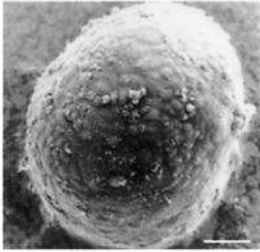
EB stages	RA	NC	SMC	APC	CMC	VSMC
	0 - 2 d	++	±	—	—	±
		10 ⁻⁷				
	2 - 5 d	+	++	++	—	n.d.
		10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸		
	> 5 d	±	—	—	+	+
					10 ⁻⁸ 10 ⁻⁹	10 ⁻⁸

Abbildung 2-3: aus Rohwedel et al. 1999. Zeitabhängiger Einfluss der Retinsäure auf die Zelldifferenzierung der Embryoidkörperchen. Die Embryoidkörperchen wurden mit unterschiedlichen Retinsäurekonzentrationen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien behandelt: Tag 0-2, Tag 2-5 und später als 5 Tage ab Bildung der Embryoidkörperchen. Zu Erkennen ist der Einfluss der Behandlung auf den Anteil von Neuronen (NC), Skelettmuskelzellen (SMC), Fettzellen (APC), Herzmuskelzellen (CMC) und Gefäßmuskelzellen (VSMC) im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. Konzentrationen der Retinsäure in mol/l. Links im Bild befinden sich elektronenmikroskopische Aufnahmen eines 2, 5 und 7 Tage alten Embryoidkörperchens.

2.2.4 Kriterien der neuronalen Differenzierung

Um die erfolgreiche Induktion der neuronalen Differenzierung beurteilen zu können, ist eine zuverlässige Identifizierung der Neurone und deren Vorläuferzellen erforderlich. Ein wichtiges Kriterium zur Identifizierung einer Nervenzelle ist die lichtmikroskopische Beurteilung. Das Problem dieser Analyse ist, dass die ES-Zellen in verschiedene Neuronenarten differenzieren, die sehr unterschiedliche Formen haben und andererseits auch nicht-neuronal differenzierte Zellen eine den Neuronen

ähnliche Morphologie besitzen können. Aus diesen Gründen müssen neben der lichtmikroskopischen Beurteilung weitere Kriterien zur Beurteilung der neuronalen Differenzierung hinzugezogen werden (Svendsen et al. 2001). Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der differenzierten Neurone und deren Vorläuferzellen bietet die immunologische Beurteilung anhand spezifischer Markerproteine. Diese können immunzytologisch und mittels Western Blot nachgewiesen werden und liefern dadurch nähere Hinweise auf das Vorliegen eines neuronalen Phänotyps. Es handelt sich beispielsweise um Strukturproteine, die als Mikrofilamente, Intermediärfilamente oder Mikrotubuli am Aufbau des neuronalen Zytoskeletts beteiligt sind.

Die erste immunzytologisch nachweisbare Determinante des neuronalen Phänotyps ist die Expression von Nestin. Nestin ist ein Intermediärfilament vom Typ IV, das in Zellen des Neuralrohres und damit in den Vorläuferzellen der Neurone während der Embryogenese vorübergehend exprimiert wird. Bei den Intermediärfilamenten werden die Typen I-IV unterschieden, wobei es sich nur beim Typ IV um die neuronenspezifischen Intermediärfilamente handelt. Aus Nestin positiven neuronalen Vorläuferzellen können alle drei wesentlichen Zellen des Zentralnervensystems hervorgehen: Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (Frederiksen und McKay 1988, Lendahl et al. 1990, Gilyarov 2008). Mit Beendigung des Differenzierungsvorgangs der neuronalen Vorläuferzellen verschwindet die Expression von Nestin und wird durch das β 3-Tubulin abgelöst, das als neuronenspezifisches Tubulin am Aufbau der neuronalen Mikrotubuli beteiligt ist. Die Expression von β 3-Tubulin beginnt in den Neuronen kurz vor oder während der letzten Mitose. β 3-Tubulin ist damit das erste Markerprotein für Neurone im postmitotischen Zustand (Caccamo et al. 1989, Katsetos et al. 2003). Mit fortschreitendem Reifegrad der Neurone und dem Auswachsen der zellspezifischen Ausläufer werden die Markerproteine Neurofilament 68 und 200 kD (NFL 68 und 200) exprimiert. Es sind neuronenspezifische Intermediärfilamente, die in Verbindung mit Kinesin und Dynein am aktiven axonalen Transport von Zellorganellen und Strukturproteinen beteiligt sind. Neurofilamente sind eine funktionelle Voraussetzung für die ordentliche Funktion postmitotischer Neurone. (Huneeus und Davison 1970, Nixon und Shea 1992). Ein weiteres Markerprotein, das den fortschreitenden Reifegrad von Neuronen anzeigt, ist das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP 2). MAP 2 ist in Verbindung mit den Mikrotubuli am Aufbau des Zytoskeletts neuronaler

Zellen beteiligt. Es kommt in den vier Isoformen MAP 2a, b, c und d vor, die durch unterschiedliches Spleißen aus einem einzigen Gen hervorgehen. MAP 2a und MAP 2b werden in den Zellkörpern und Dendriten der Neurone exprimiert und sind an der Entwicklung und Funktion der Dendriten beteiligt. Die Isoform MAP 2c ist dagegen nur vorübergehend im sich entwickelnden Neuron während der Ausbildung der Synapsen im Embryonalstadium vorhanden (De Camilli et al. 1984, Tucker 1990, Riederer et al. 1995). Neben den Strukturproteinen des Zytoskeletts sind auch Membranproteine als neuronale Marker geeignet. Hierzu gehört das Glycoprotein Synaptophysin, das in den Membranen der präsynaptischen Vesikel lokalisiert ist. Diese Vesikel fusionieren beim Ankommen eines Aktionspotentials mit der neuronalen Zellmembran an der Synapse, setzen den neuronenspezifischen Transmitter frei und übertragen auf diese Weise die Erregung des Neurons auf das Nachfolgende. Die präsynaptischen Vesikel sind in den Neuronen intrazellulär um die Synapsen, aber auch an motorischen Endplatten lokalisiert (Wiedenmann und Franke 1985, Valtorta et al. 2004).

3 Ziel der Arbeit

Protokolle zur in-vitro-Differenzierung embryonaler Stammzellen in Neurone wurden bereits mehrfach beschrieben. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines solchen Protokolls zur neuronalen Differenzierung vor Ort im institutseigenen Labor. Unter Anwendung von Retinsäure sollte eine gerichtete Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus in Neurone induziert werden. Durch Optimierung der Nährmedien und zusätzliche Selektionsschritte sollte eine möglichst hohe Reinheit der resultierenden neuronalen Vorläuferzellen beziehungsweise der reifen postmitotischen Neurone erreicht werden. Die Durchführung der sich anschließenden Neuronenkultur sollte außerdem speziell an die Ansprüche der aus den embryonalen Stammzellen differenzierten Neurone angepasst werden. Das etablierte Protokoll soll im Rahmen der Grundlagenforschung und der Erforschung genetisch bedingter Krankheiten im institutseigenen Labor routinemäßig eingesetzt werden können.

4 Materialien und Methoden

4.1 Zellkultur

Die Verarbeitung aller in dieser Arbeit beschriebenen eukaryoten Zellen erfolgte in einem Zellkulturlabor unter einer Sterilbank. Alle Medien und Lösungen sowie die Verbrauchsmaterialien waren steril. Die Kultur der Zellen erfolgte, sofern nicht anders erwähnt, im Wärmeschrank in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil bei 37 °C.

4.1.1 Allgemeine Methoden

4.1.1.1 Beschichtung der Zellkulturgefäße

Die Zellkulturflaschen und -schalen wurden für 20 Minuten mit einer 0,1% Gelatinelösung bei 37 °C inkubiert. Nach Absaugen und Trocknen konnten die Zellen auf den Zellkulturflaschen beziehungsweise -schalen ausgesät werden.

0,1% Gelatinelösung	Gelatine	0,1 g
	PBS	100 ml

Durch Aufkochen wurde die Gelatine in PBS gelöst und anschließend mit einem Spritzenfilter (Porengröße 0,22 µm) sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

4.1.1.2 Ablösen und Vereinzeln der Zellen

Nach Absaugen des Nährmediums von den Zellkulturschalen beziehungsweise -flaschen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Trypsinierung erfolgte für ca. 2 Minuten mit Trypsin/EDTA 0,05% oder 0,25% bei 37 °C, wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls durch leichtes Klopfen unterstützt. Durch Zugabe der doppelten Menge eines Mediums mit fetalem Kälberserum (FCS)

wurde der Trypsinierungsvorgang gestoppt und die Zellen durch Titrierung mit einer Pipette vereinzelt. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur (1000 U/min, 3 min) wurden die Zellen im neuen Medium resuspendiert und konnten weiterverarbeitet werden.

4.1.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden nach Zählung in der Neubauer-Zählkammer zentrifugiert und das überstehende Medium entfernt. Anschließend wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert und in Gefrier Röhrchen überführt. Die Menge des verwendeten Einfriermediums war dabei von der vorhandenen Zellmenge und der gewünschten Endkonzentration abhängig. Der Einfriervorgang erfolgte langsam, aber unmittelbar nach Resuspension der Zellen. Zunächst wurden die Zellen für 2 - 3 Stunden bei -20 °C eingefroren, danach wurden sie in eine -80 °C Tiefkühltruhe gebracht. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Gefrier Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C zügig erwärmt. Die Zellsuspension wurde in 5 ml vorgewärmtes Nährmedium überführt und zentrifugiert (1000 U/min, 3 min). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert.

Einfriermedium	FCS	50%
	DMEM	40%
	DMSO	10%

Zum Einfrieren embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) wurde DMEM (*high glucose, no pyruvate, 25 mM HEPES*), zum Einfrieren embryonaler Mausfibroblasten (MEF-Zellen) wurde DMEM (*high glucose, no pyruvate, with glutamax*) verwendet.

4.1.2 Kultur embryonaler Mausfibroblasten

Die zur Kultur der ES-Zellen erforderlichen MEF-Zellen wurden aus Mausembryos 13,5 Tage nach der Befruchtung isoliert und freundlicherweise von Prof. Hübner zur Verfügung gestellt. Die Expansion der MEF-Zellen erfolgte auf gelatinebeschichteten Zellkulturflaschen im MEF-Medium. In einer 650 ml Zellkulturflasche (175 cm^2) wurden ca. 2×10^6 vermehrungsfähige MEF-Zellen ausgesät. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA 0,05% abgelöst, vereinzelt (siehe 4.1.1.2) und im Verhältnis 1:3 bis 1:5 auf gelatinebeschichtete Zellkulturflaschen gleicher Größe aufgeteilt. Nach Abschluss der Expansion und vor Verwendung wurden die MEF-Zellen für zwei Stunden in einem mit 10 µg/ml Mitomycin versetzten MEF-Medium inkubiert. Mitomycin ist ein Zytostatikum, das durch kovalente Verbindung beider DNA-Einzelstränge die Replikation und damit die Zellteilung einer Zelle unmöglich macht. Nach diesem Schritt konnten die Fibroblasten abgelöst und als Ammenzellen für die Kultur embryonaler Stammzellen verwendet werden. Nicht verwendete Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro Milliliter in flüssigem Stickstoff eingefroren (siehe 4.1.1.3).

MEF-Medium	DMEM	
	<i>(high glucose, no pyruvate,</i>	
	<i>with glutamax)</i>	500 ml
	FCS	50 ml
	MEM/NEAA	5,5 ml
	Pen/Strep	5,5 ml

4.1.3 Kultur embryonaler Stammzellen

Die Kultur der ES-Zellen der Maus wurde anhand im institutseigenen Labor etablierter Protokolle in Co-Kultur mit MEF-Zellen (siehe 4.1.2) durchgeführt.

Zur Bildung der für die Kultur von ES-Zellen notwendigen MEF-Zellschicht wurden teilungsinaktivierte MEF-Zellen in einer Konzentration von ca. 2×10^6 Zellen pro 10 cm^2 Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wurden dazu nach Auftauen und Zentrifugation

(1000 U/min, 3 min) in frischem MEF-Medium resuspendiert und auf die gelatinebeschichteten Zellkulturschalen verteilt. Nach ca. 4 Stunden Inkubationszeit waren die Fibroblasten am Schalenboden adhären, so dass sie einmal mit PBS gespült und anschließend mit Proliferationsmedium kultiviert werden konnten.

Zur Anzucht der ES-Zellen wurden pro 10 cm-Zellkulturschale ca. 1×10^6 ES-Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in vorgewärmtes Proliferationsmedium gegeben und nach Zentrifugation (1000 U/min, 3 min) erneut in Proliferationsmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf die mit den MEF-Zellen versehenen Zellkulturschalen verteilt und bei 37 °C / 5% CO₂ inkubiert. Ein Mediumwechsel war täglich erforderlich, spätestens beim Abfall des pH-Wertes, der durch Gelbfärbung des Medium angezeigt wurde. Beim Mediumwechsel wurde ca. $\frac{3}{4}$ des Proliferationsmediums ersetzt. Durch den von den MEF-Zellen produzierten und exogen zugegebenen Wachstumsfaktor LIF (Smith et al. 1988, Williams et al. 1988) konnten die ES-Zellen im undifferenzierten Stadium expandiert werden.

Die ES-Zellen wurden bei ca. 70% Konfluenz mit PBS/EDTA gespült, mit Trypsin/EDTA 0,25% abgelöst und vereinzelt (siehe 4.1.1.2). Nach Zentrifugation (1000 U/min, 3 min) und Resuspension in neuem Medium konnten die ES-Zellen zur weiteren Expansion auf 3 - 5 Zellkulturschalen gleicher Größe mit MEF-Zellen aufgeteilt oder zur neuronalen Differenzierung weiterverarbeitet werden.

PBS/EDTA	PBS	500 ml
	EDTA	100 mg

EDTA in einer geringen Menge PBS auflösen, vor Zugabe des restlichen PBS sterilfiltrieren

Proliferationsmedium

DMEM	
<i>(high glucose, no pyruvate,</i>	
<i>25 mM HEPES)</i>	500 ml
FCS	92 ml
Glutamin	6,2 ml
MEM/NEAA	6,2 ml

	Pen/Strep	6,2 ml
	Nukleosidmix	6,2 ml
	Sodium pyruvate	6,2 ml
	LIF	62 μ l
	2-Mercaptoethanol	1,24 ml
Nukleosidmix	Adenosin	80 mg
	Guanosin	85 mg
	Cytidin	73 mg
	Uridin	73 mg
	Thymidin	24 mg

Die Nukleoside wurden als vorbereiteter und bei -20 °C gelagerter Nukleosidmix in 100-facher Konzentration verwendet. Sie wurden bei 37 °C in 100 ml PBS gelöst und sterilfiltriert.

4.1.4 Trennung der embryonalen Stammzellen von den embryonalen Mausfibroblasten

Die MEF-Zellen erwiesen sich bei der Bildung der Embryoidkörperchen und der damit einhergehenden Differenzierung als störend. Aus diesem Grund wurde das Zellgemisch nach einem Protokoll von Oyamada et al. (1996) in zwei Schritten von den MEF-Zellen befreit. Hierbei machte man sich die schnellere Sedimentationsgeschwindigkeit und Anheftung der MEF-Zellen zu Nutze.

Nach der Vereinzelung der ES-Zellen wurden jeweils 10 ml Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und senkrecht für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig 7,5 ml Zellsuspension von oben abpipettiert und in eine mit Gelatine beschichtete 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Nach weiteren 20 Minuten Inkubationszeit wurde die Zellsuspension vorsichtig in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde für die neuronale Differenzierung verwendet. Die im ersten Falcon-Röhrchen verbliebene restliche Zellsuspension wurde zur weiteren Expansion der ES-Zellen verwendet oder eingefroren (siehe 4.1.1.3).

4.1.5 Neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen

Nach dem Entzug von LIF begann die Differenzierung der ES-Zellen mit der gleichzeitigen Bildung der Embryoidkörperchen. Zur Bildung von Embryoidkörperchen gab es zwei verschiedene experimentelle Ansätze: die Bildung in Suspension oder im hängenden Tropfen. Dem Differenzierungsmedium wurde Retinsäure zur gezielten Induktion der neuronalen Differenzierung zugegeben. Die Differenzierung der ES-Zellen erfolgte ohne Zugabe von Antibiotika, um eine hierdurch mögliche Beeinträchtigung der Differenzierung zu vermeiden.

4.1.5.1 Suspensionskultur

Der Bildung von Embryoidkörperchen in Suspensionskultur nach Okabe et al. (1996) ging eine zweitägige Anzucht der aufgereinigten ES-Zellen (siehe 4.1.4) im ES-Proliferationsmedium voran. Dazu wurden 2×10^6 aufgereinigte ES-Zellen zentrifugiert, in neuem ES-Medium resuspendiert und auf gelatinebeschichtete 6 cm Zellkulturschalen verteilt. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen dreimal mit PBS/EDTA gespült. Die entstandenen Zellkolonien wurden nun mit Trypsin/EDTA 0,05% abgelöst, ohne dass eine komplette Vereinzellung erfolgte (siehe 4.1.1.2). Damit größere Zellcluster erhalten blieben, wurde der Trypsinierungsvorgang rechtzeitig mit Differenzierungsmedium ohne *leukaemia inhibitory factor* (LIF) gestoppt. Nicht abgelöste Zellen wurden mit Hilfe einer 1 ml Pipettenspitze mit abgeschnittener Spitze vorsichtig abgespült. Die Zellcluster jeweils einer 6 cm Zellkulturschale wurden anschließend zu gleichen Teilen auf zwei mit Differenzierungsmedium ohne LIF befüllte nicht-adhäsive 10 cm Petrischalen verteilt und bei 37 °C / 5% CO₂ inkubiert. Dem Differenzierungsmedium wurde während der ersten beiden Tage Retinsäure zugesetzt, so dass eine Endkonzentration von 5×10^{-8} mol/l, 1×10^{-7} mol/l beziehungsweise 5×10^{-7} mol/l entstand. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Für den Mediumwechsel wurde der gesamte Inhalt beider Petrischalen mit einer großlumigen 10 ml Pipette in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dieses wurde bis zur vollständigen Sedimentation der Embryoidkörperchen senkrecht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert (ca. 30 Minuten). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und gegen die gleiche Menge

neuen Mediums ohne Retinsäure ersetzt. Die Embryoidkörperchen wurden resuspendiert und auf zwei neue Petrischalen verteilt. Nach acht Tagen wurden die Embryoidkörperchen ausplattiert.

Differenzierungsmedium

DMEM	
<i>(high glucose, no pyruvate,</i>	
<i>with glutamax)</i>	500 ml
FCS (hitzeinaktiviert)	2%, 5% bzw. 10%
Glutamin	6,2 ml
MEM/NEAA	6,2 ml
Nukleoside	6,2 ml
Natriumpyruvat	6,2 ml
2-Mercaptoethanol	1,24 ml
1 M HEPES (s. 4.1.10.4)	13 ml

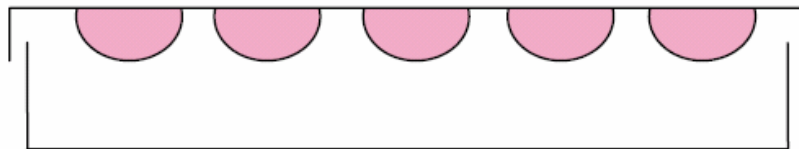
Das zur Differenzierung verwendete FCS wurde vor Gebrauch für 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert. Mit diesem Schritt wurden störende Einflüsse auf die Differenzierung durch aktive Enzyme, beispielsweise durch das Komplementsystem, verhindert.

Die im Wasser schwerlösliche Retinsäure wurde in 100% Ethanol in einer Konzentration von 1×10^{-5} mol/l gelöst. Nach Sterilfiltration erfolgte die Lagerung bei -80 °C für maximal 14 Tage.

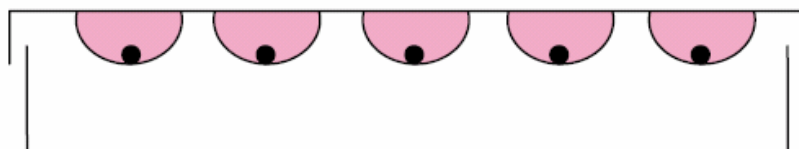
4.1.5.2 Kultur im hängenden Tropfen

Die Herstellung von Embryoidkörperchen im hängenden Tropfen erfolgte mit den von MEF-Zellen gereinigten und vollständig vereinzelter ES-Zellen (siehe 4.1.4). Nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer und anschließender Zentrifugation (1000 U/min, 3 min) wurden die Zellen in Differenzierungsmedium (siehe 4.1.5.1) unter Zugabe von Retinsäure in einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l, 5×10^{-7} mol/l beziehungsweise 5×10^{-8} mol/l resuspendiert. Dabei wurde eine Zellkonzentration 37500 Zellen pro Milliliter Medium eingestellt. Die Zellsuspension

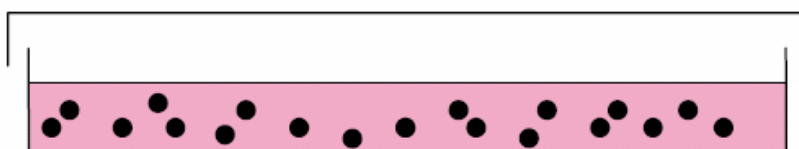
wurde als 20 µl Tropfen (750 Zellen) auf die Innenseite der Deckel von Zellkulturschalen pipettiert. Um das Verdunsten der hängenden Tropfen zu vermeiden, wurden die Schalenböden mit Differenzierungsmedium befüllt. Nachdem die Deckel vorsichtig umgedreht und auf das Unterteil der Schalen gelegt worden waren, erfolgte die Inkubation für zwei Tage bei 37 °C / 5% CO₂. Anschließend wurden die Deckel vorsichtig von den Schalen genommen, umgedreht und die Tropfen mit Differenzierungsmedium abgespült. Die abgespülten Tropfen mit den Embryoidkörperchen wurden in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und nach Sedimentation und Absaugen des alten Mediums in retinsäurefreiem Differenzierungsmedium resuspendiert. Die Embryoidkörperchen wurden auf nicht-adhäsiven Petrischalen für weitere sechs Tage als Suspension kultiviert (Abbildung 4-1).



Tag 0:
Hängende Tropfen mit jeweils 750 ES-Zellen/20µl Zellsuspension



Tag 1-3:
Bildung der Embryoidkörperchen



Tag 3-8:
Kultur in Suspension in nicht-adhäsiven Petrischale

Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der Kultur von ES-Zellen in hängenden Tropfen.

4.1.6 Ausplattierung der Embryoidkörperchen

Für die weitere Differenzierung und Selektion neuronaler Vorläuferzellen war das Anheften der Embryoidkörperchen auf dem Boden von Zellkulturschalen erforderlich. Bevor die Embryoidkörperchen ausplattiert wurden, erfolgte ein Sedimentationsschritt mit Mediumwechsel (siehe 4.1.5.1). Die im Differenzierungsmedium resuspendierten Embryoidkörperchen wurden auf gelatinebeschichtete Zellkulturschalen verteilt. Bei der Menge der ausplattierten Embryoidkörperchen war zu beachten, dass sie sich am Schalenboden ausbreiten und sich trotzdem nicht überlappen sollten. Für immunzytologische Färbungen wurde ein Teil der Embryoidkörperchen auf Poly-L-Lysinbeschichteten Deckgläschen (siehe 4.1.8.1) ausplattiert.

4.1.7 Selektion neuronaler Vorläuferzellen

Die Selektion der neuronalen Vorläuferzellen erfolgte durch ein modifiziertes serumfreies Selektionsmedium nach Okabe et al. (1996). Dieses Medium enthielt Insulin, Transferrin und Natriumselenit (ITS-Selektionsmedium) und begünstigte das Überleben speziell der neuronalen Vorläuferzellen. 24 Stunden nach Ausplattierung der Embryoidkörperchen (siehe 4.1.6) wurde das alte Medium entfernt und nach einmaligem Spülen mit PBS das ITS-Selektionsmedium zugegeben. Der Mediumwechsel wurde täglich durchgeführt. Die Selektion erfolgte 9 Tage.

ITS-Selektionsmedium

DMEM/F12 (1:1)	500 ml
Insulin (Stocklösung)	500 µl
Transferrin (Stocklösung)	2,5 ml
Natriumselenit (Stocklösung)	30 µl

Stocklösungen

Insulin	5 mg/ml Insulin wurde in 0,01 M Natronlauge gelöst, mit einem Spritzenfilter (0,22 µm) sterilfiltriert und bei -80 °C aufbewahrt.
Transferrin	50 mg/ml Transferrin wurden in demineralisiertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.
Natriumselenit	Mit demineralisiertem Wasser wurde eine 500 µM Lösung hergestellt. Nach Sterilfiltration wurde die Lösung bei -20 °C gelagert.

4.1.8 Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen in Neurone**4.1.8.1 Vorbereitung der Deckgläschen**

Zur Reinigung wurden die Deckgläschen (rund, Durchmesser 15 mm) in 10% SDS-Lösung entfettet. Nach Spülen in demineralisiertem Wasser wurden die Deckgläschen zuerst in 70% Ethanol, dann in 96% Ethanol gewaschen und abgeflammt. Für die kontaktlose Co-Kultur mit Gliazellen wurden mit einer Pasteurpipette drei gleichmäßig große Tropfen aus heißem Paraffin (autoklaviert) randständig auf eine Seite der Deckgläschen getropft. Die Paraffintropfen dienten als Abstandhalter, damit die Deckgläschen nicht direkt auf der Gliazellschicht lagen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit einer Poly-L-Lysinlösung (1 mg/ml) beschichtet und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgesaugt und dreimal mit HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gespült. Zur besseren Anheftung und Differenzierung der neuronalen Vorläuferzellen wurden die Deckgläschen zusätzlich mit einer Lamininlösung (10 µg/ml) für 30 Minuten bei 37 °C beschichtet. Diese Lösung wurde anschließend nur abgesaugt und nicht abgespült.

SDS-Lösung 10%	SDS	20 g
	Demineralisiertes Wasser	200 ml

Poly-L-Lysinlösung 1 mg/ml Poly-L-Lysin in Boratpuffer gelöst und sterilfiltriert

Boratpuffer	Borsäure	1,24 g
	Borax	1,90 g
	demineralisiertes Wasser	400 ml

Lamininlösung 10 µg/ml Laminin mit PBS gelöst und sterilfiltriert

4.1.8.2 Neuronenkultur ohne Gliazellen

Für die weitere Ausdifferenzierung der neuronalen Vorläuferzellen aus den ES-Zellen wurde das Protokoll von Okabe et al. (1996) zu Grunde gelegt. Das dafür erforderliche N3-Medium wurde in modifizierter Form übernommen. Die nach 9 Tagen unter Selektionsbedingungen zurückgebliebenen neuronalen Vorläuferzellen wurden nach Entfernen des Selektionsmediums dreimal mit HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gespült, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Durch Zugabe von Trypsinlösung 0,1% wurden die Zellen vom Schalenboden gelöst und vereinzelt. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium beendet. Nach Zentrifugation (1000 U/min, 10 min) wurde das Zellpellet in N3-Medium mit 0,1% DNase resuspendiert und durch drei Pasteurpipetten mit immer enger werdenden Öffnungen titriert, um alle Zellen vollständig zu vereinzeln. Restliche Zellkonglomerate wurden entfernt, indem die Zellsuspension durch ein Mikrosieb mit der Porengröße 70 µm filtriert wurde. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1000 U/min, 10 min) und das Zellpellet in N3-Medium + 5% Pferdeserum resuspendiert. Jeweils 250.000 Zellen wurden auf die 6 cm Zellkulturschalen, in denen sich die beschichteten Deckgläschen (siehe 4.1.8.1) befanden, ausgesät. Wurde eine Gliazell-Co-Kultur angestrebt (siehe 4.1.8.3), so wurden Zellkulturschalen mit den mit Paraffinpunkten versehenen Deckgläschen verwendet. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen vorinkubiertes N3-Medium + 1% Pferdeserum getauscht. Zusätzlich wurden diesem Medium die neurotrophen Faktoren *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *nerve growth factor* (NGF) und *neurotrophin 3* (NT3) in der Konzentration 10 ng/ml hinzugefügt (Cohen und Levi-

Montalcini 1956, Barde et al. 1982, Maisonpierre et al. 1990, Mattson 2008). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 - 5 Tage, indem ein Drittel des Mediums ersetzt wurde. Alle 2 Tage erfolgte die erneute Zugabe der neurotrophen Faktoren.

Trypsinlösung 0,1% 0,1 g Trypsin aus dem Rinderpankreas wurde bei 4 °C in 100 ml PBS aufgelöst und sterilfiltriert.

N3-Medium	DMEM / F12 (1:1)	500 ml
	Insulin (Stocklösung, s. 4.1.7)	2,5 ml
	Progesteron (Stocklösung)	500 µl
	Putrescine (Stocklösung)	500 µl
	Natriumselenit (Stocklösung s. 4.1.7)	30 µl
	Transferrin (Stocklösung s. 4.1.7)	2,5 ml
	Pen/Strep	5 ml

Dem N3-Medium wurde nach Bedarf 5% beziehungsweise 1% hitzeinaktiviertes Pferdeserum zugefügt.

Stocklösungen

Progesteron Mit Ethanol (100%) wurde eine 20 µM Lösung hergestellt und nach Sterilfiltration bei -80 °C gelagert.

Putrescine Mit demineralisiertem Wasser wurde eine 0,1 M Lösung hergestellt, sterilfiltriert und bei -80 °C gelagert.

4.1.8.3 Gliazell-Co-Kultur (Langzeitkultur)

Die Langzeitkultur der Neurone aus ES-Zellen erfolgte als kontaktlose Co-Kultur über Gliazellen. Die Gliazellen wurden aus embryonalen Maushirnen isoliert und wuchsen auf Poly-L-Lysinbeschichteten Zellkulturschalen unter Gliazellmedium bei 37 °C / 5% CO² (siehe 4.1.8.5). Bei Konfluenz erfolgte die Aufteilung im Verhältnis 1:3. Einen Tag vor Zugabe der neuronalen Zellen wurden die Gliazellen mit Mitomycin teilungsinaktiviert (siehe 4.1.2) und das Medium gegen N3-Medium mit 1% Pferdeserum (siehe 4.1.8.2) ausgetauscht. Die neuronalen Zellen auf den mit

Paraffinpunkten versehenen Deckgläschen wurden nach 24 Stunden aus dem N3-Medium mit 5% Pferdeserum entnommen und in die Zellkulturschalen mit Gliazellen überführt. Die zellbewachsene Seite zeigte nach unten, ohne jedoch direkten Kontakt zur Gliazellschicht zu haben. Die neurotrophen Faktoren BDNF, NGF und NT3 in der Konzentration 10 ng/ml wurden ebenfalls beigefügt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3 - 5 Tage, wobei ein Drittel des Mediums gegen vorinkubiertes Neuronenmedium I ausgetauscht wurde. Alle 2 Tage erfolgte die erneute Zugabe der neurotrophen Faktoren.

Neuronenmedium I	Neurobasalmedium	49 ml
	B27-Supplement	1 ml
	N2-Supplement	500 µl
	Pferdeserum	100 µl
	β-Mercaptoethanol	30 µl

4.1.8.4 Isolation und Kultur primärer hippocampaler Neurone

Die primären Neurone wurden anhand eines im institutseigenen Labor etablierten Protokolls aus den Hippocampi von Mäuseembryonen am Tag 16,5 nach Befruchtung isoliert. Sie dienten als Referenz für die Charakterisierung der aus ES-Zellen differenzierten Neurone.

Die schwangere Maus wurde durch HWS-Dislokation getötet und anschließend mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Bauchhaut wurde aufgeschnitten und zur Seite gezogen, so dass die Bauchmuskulatur ein weiteres Mal desinfiziert werden konnte. Der Bauchraum wurde eröffnet und der Uterus mit den Embryonen entnommen. Nach Dekapitation wurden die Gehirne der Embryonen entnommen und sofort in HBSS auf Eis zwischengelagert. Unter einem Präparationsmikroskop wurden die Kortexhälften aller Gehirne getrennt und nach Befreiung von den Hirnhäuten die Hippocampi isoliert. Nach dreimaligem Spülen mit HBSS (mit HEPES; 4 °C) wurden die Hippocampi für 15 Minuten mit Trypsin/EDTA (mit HEPES) bei 37 °C inkubiert und gelegentlich leicht geschüttelt. Die Trypsinierung wurde durch dreimaliges Spülen mit HBSS gestoppt. Anschließend wurden die Hippocampi mit drei immer

enger werdenden Pasteurpipetten bis zur vollständigen Homogenisierung mechanisch vereinzelt. Jeweils 150.000 Zellen wurden auf die mit Deckgläschen und Platingmedium vorbereiteten Zellkulturschalen verteilt. Nach 30 Minuten wurden die Deckgläschen entnommen, umgedreht und in Zellkulturschalen mit einer Gliazellschicht und vorinkubiertem Neuronenmedium II gelegt. Alle vier Tage wurde ein Drittel des Mediums gewechselt.

1 M HEPES:	HEPES	23,8 g
	demineralisiertes Wasser	100 ml
	mit Natronlauge (10 M) auf pH 7,25 einstellen; sterilfiltrieren	

Trypsin/EDTA (mit HEPES)

Trypsin EDTA 0,05% (4 °C)	100 ml
Pen/Strep	1 ml
1 M HEPES	1 ml

HBSS (mit HEPES)	HBSS	500 ml
	Pen/Strep	5 ml
	1 M HEPES	3,5 ml

Platingmedium	MEM	90 ml
	Pferdeserum	10 ml
	Glucose	600 mg

Neuronenmedium II	Neurobasalmedium	48,750 ml
	B27 Supplement	1 ml
	L-Glutamine 200 mM	250 µl

4.1.8.5 Isolation von Gliazellen

Zur Isolation der Gliazellen für die Gliazell-Co-Kultur wurden die bei der Präparation der Hippocampi übrig gebliebenen Kortexhälften verwendet. Hierzu wurden die Kortexhälften dreimal mit HBSS gewaschen und mit 37 °C warmem Trypsin/EDTA

(mit HEPES; siehe 4.5.8.4) für 25 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin vorsichtig entfernt und die Kortexhälften dreimal mit HBSS gewaschen. Jeweils zwei Kortexhälften wurden in 2 ml HBSS mit drei immer enger werdenden Pasteurpipetten vereinzelt und zentrifugiert (1660 U/min, 3 min). Das Zellpellet wurde in 10 ml Gliazellmedium resuspendiert und auf eine Poly-L-Lysinbeschichtete (Poly-L-Lysin 0,1 mg/ml in PBS gelöst) 10 cm Zellkulturschale ausgesät. 24 Stunden nach Ausplattierung der Gliazellen wurde das Gliazellmedium abgesaugt, dreimal mit HBSS gespült und gegen frisches Gliazellmedium ausgetauscht. Innerhalb von 7 Tagen waren die Gliazellen konfluent, so dass sie im Verhältnis 1:3 - 1:5 auf neue Poly-L-Lysinbeschichtete Zellkulturschalen aufgeteilt werden konnten.

Gliazellmedium	DMEM (<i>high glucose, with pyruvat</i>)	85 ml
	Pen/Strep	1 ml
	FCS	10 ml
	Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	5 ml

4.2 Immunzytologie

4.2.1 Antikörper

Das Prinzip der Immunzytologie beruht auf der spezifischen Bindung eines Antikörpers (Primärantikörper) an sein entsprechendes Antigen. Diese spezifische Bindung wird durch einen zweiten Antikörper (Sekundärantikörper), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, sichtbar gemacht. Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tabelle 4-1: Liste der verwendeten Primärantikörper. *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP), Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP), Neurofilament (NFL).

Antigen	Herkunft		Verdünnung	Hersteller
β3-Tubulin	Kaninchen	polyklonal	1:100	Sigma
β3-Tubulin	Maus	Monoklonal	1:100	Chemicon
GFAP	Kaninchen	polyklonal	1:200	Sigma
Nestin	Maus	monoklonal	1:100	Chemicon
MAP 2	Kaninchen	polyklonal	1:200	Chemicon
NFL 68 kD	Maus	monoklonal	1:100	Sigma
NFL 200 kD	Maus	monoklonal	1:100	Chemicon
Synaptophysin	Kaninchen	polyklonal	1:500	Cell Signaling

Der Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet, der als Antigen einer fremden Tierart erkannt und gebunden wird. Durch einen gekoppelten Immunfluoreszenzfarbstoff wird der Primärantikörper sichtbar gemacht. Um zwei verschiedene Proteine im gleichen Präparat immunzytologisch darstellen zu können, wurden jeweils zwei Primärantikörper unterschiedlicher Herkunftstiere und die entsprechenden Sekundärantikörper verwendet (Tab. 4-2).

Tabelle 4-2: Liste der verwendeten Sekundärantikörper mit Zielantigenen (Primärantikörper), Arbeitsverdünnungen und Herstellern.

Farbstoff	Zielantigen	Verdünnung	Hersteller
Cy3	Maus	1:400	Dianova
FitC	Kaninchen	1:300	Dianova

Die Primär- und Sekundärantikörper wurden zur Verwendung mit PBS + 5% Ziegsenrum verdünnt. Das in Tabelle 1 beschriebene Verdünnungsverhältnis musste dabei für beide Antikörper in Lösung gleichzeitig erfüllt sein. Die Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff TO-PRO 3 Iodide (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt. Die Kernfärbung war jeweils der dritte Farbstoff im Präparat und wurde im Verhältnis 1:500 mit PBS verdünnt. Alle Antikörper wurden auf Eis aufgetaut und gelagert.

4.2.2 Fixierung

Die Deckgläschen wurden aus dem Medium entnommen und mit der bewachsenen Seite nach oben in Petrischalen gelegt. Die Zellen wurden zweimal vorsichtig mit PBS gespült bevor sie für 10 Minuten mit 4% Paraformaldehydlösung bei Raumtemperatur fixiert wurden. Diese wurde durch dreimaliges Spülen mit PBS entfernt und gegen 0,25% Tritonlösung ersetzt. Die Tritonlösung diente hierbei zur Permeabilisierung der Zellmembran, so dass die Antikörper in die Zellen eindringen und an ihre Zielstrukturen binden konnten. Nach 15 Minuten Einwirkzeit wurde dreimal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Petrischalen mit WTBS-Lösung + 5% Ziegenserum gefüllt. Durch das Ziegenserum wurden unspezifische Bindungsstellen für Antikörper blockiert, um falsch positive Ergebnisse zu verringern. Die auf den Deckgläschen fixierten Zellen waren in dieser Lösung für einige Wochen bei 4°C haltbar.

WTBS-Lösung	PBS	100 ml
	FCS	1 ml
	Triton	250 µl
	Natriumazid	20 mg

0,25% Tritonlösung	PBS	100 ml
	Triton	250 µl

4% Paraformaldehydlösung pH 7,4

Paraformaldehyd	4 g
PBS	100 ml

Wegen der schweren Löslichkeit des Paraformaldehyds in PBS wurde das Gemisch auf einem Magnetrührgerät auf 60 °C erhitzt und durch 2 - 3 Tropfen Natronlauge (1 M) auf pH 7,4 eingestellt. Nach mehrstündigem Rühren war die Lösung klar.

4.2.3 Antikörperfärbung

Parafilm diente als Unterlage für den Färbevorgang. Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen wurden mit der bewachsenen Seite nach oben auf den Parafilm gelegt. Vorhandene Paraffinpunkte wurden vorher mit Pinzetten entfernt. Die Deckgläschen wurden dreimal mit PBS gespült. Nach der letzten Spülung wurden die Deckgläschen umgedreht und mit ihrer bewachsenen Seite auf einen 30 µl Tropfen der Primärantikörperlösung gelegt. Die Einwirkzeit des Primärantikörpers betrug 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Ende der Einwirkzeit wurden die Deckgläschen vorsichtig mit PBS unterspült und wieder umgedreht. Es folgten drei Spülungen mit PBS um ungebundene Reste der Primärantikörper zu entfernen. Danach wurden die Deckgläschen wieder umgedreht und auf einen 30 µl Tropfen der Sekundärantikörperlösung gelegt. Die Einwirkzeit der Sekundärantikörper betrug 45 Minuten bei Raumtemperatur. Sie erfolgte lichtgeschützt. Für den dritten Färbeschritt, die Kernfärbung, wurden die Deckgläschen umgedreht und dreimal mit PBS abgespült bevor 80 µl TO-PRO 3 Iodide in der Verdünnung 1:500 direkt auf die bewachsene Oberfläche der Deckgläschen pipettiert wurde. Die Einwirkzeit betrug 15 Minuten. Durch dreimaliges Spülen wurde der Kernfarbstoff wieder entfernt. Nach dem letzten Spülschritt wurden die Deckgläschen abgesaugt, seitlich abgetupft und mit der bewachsenen Seite auf einen Objektträger gelegt, der mit einem Tropfen ProLong Gold Antifade Reagent versehen war. Nach Trocknung bei 4 °C über Nacht wurden die Deckgläschen mit handelsüblichem klarem Nagellack an der Glaskante bestrichen, damit ein luftdichter Abschluss zwischen Deckgläschen und Objektträger entstand. Die Präparate waren so dauerhaft konserviert und konnten nach Reinigung ausgewertet werden.

4.2.4 Auswertung am Mikroskop

Die lebenden Zellen in den Zellkulturschalen und Petrischalen wurden mit einem Durchlichtmikroskop (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, Jena) beobachtet und fotografisch dokumentiert. Die immunzytologischen Präparate wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss, Jena) ausgewertet und fotografisch dokumentiert.

4.3 Western Blot

4.3.1 Lyse der Zellen

Für den Western Blot der Embryoidkörperchen war zunächst deren Lyse erforderlich. Die Embryoidkörperchen wurden dreimal mit PBS gespült. Bei der dritten Spülung wurde PBS mit einer Temperatur von 4 °C verwendet. Nach Zugabe von Lysepuffer wurde die Suspension lysiert, indem sie zweimal mit einer 1 ml Spritze durch eine 0,6x25 mm Kanüle aufgezogen und wieder ausgedrückt wurde. Anschließend wurde die Kanüle durch eine 0,4x20 mm Kanüle ersetzt und der Vorgang wiederholt. Das entstandene Zellhomogenat wurde unmittelbar nach diesem Vorgang auf Eis gelagert.

Lysepuffer	Tris HCl (1,5 mol/l, pH 8,8)	2 ml
	EDTA (0,5 mol/l, pH 8)	1 ml
	SDS-Lösung 20%	15 ml
	Natriumfluorid 1M	3 ml
	Glycerol	10 ml
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Die Lagerung des Lysepuffers erfolgte bei Raumtemperatur. Vor Verwendung wurde 2 µg/ml Aprotinin hinzugefügt. Tris und EDTA wurden in der benötigten Konzentration in Aqua bidest. gelöst und der pH-Wert mit 1M Natronlauge beziehungsweise konzentrierter Salzsäure eingestellt.

4.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Proteinbestimmung der Zellhomogenate erfolgte mit dem Bradford Protein Assay Reagenz (Bio Rad, München) nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus der Absorption nach dem Lambert-Beerschen Absorptionsgesetz wurde mit IgG aus Rinderserum (Bio Rad, München) eine Standardreihe erstellt. IgG wurden dazu in einer Konzentration von 1 mg/ml in Aqua bidest. gelöst. Zur Erstellung der Standardreihe wurde die Lösung mit 0,1 M

Natronlauge auf 0,1 mg/ml verdünnt. Die Proben der lysierten Embryoidkörperchen wurden ebenfalls mit 0,1 M Natronlauge verdünnt und anschließend im Spektrometer (Bio Rad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

4.3.3 Elektrophorese im SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (1970)

Die Zellhomogenate wurden nach der Proteinbestimmung auf eine Proteinkonzentration von 2 µg/µl eingestellt. Für den Western Blot wurden die Proben mit 6-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Proteine wurden über ein denaturierendes diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurde auf ein Trenngel (8% beziehungsweise 10%; siehe Tab. 4-3) nach Aushärtung ein Sammelgel (5%) gegossen. Durch einen Kamm wurden Taschen zur Beladung im Sammelgel freigehalten. Das Gel härtete über Nacht aus und wurde anschließend im Laufpuffer mit den Proben beladen. Ein Molekulargewichtsstandard (Broad Range, Bio Rad; High Range, Bio Rad), der in einer Tasche mitgeführt wurde, diente der späteren Zuordnung der Proteine. Die Elektrophorese wurde mit einer Stromstärke von 5 mA/Gel gestartet, nach 20 Minuten wurde die Spannung in Abhängigkeit von der Gelkonzentration auf 120-150 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront die Unterkante erreicht hatte.

Tabelle 4-3: Trenngele in unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen

Trenngel	8%	10%
H ₂ O in ml (Aqua bidest.)	4,6	4,0
30% Acrylamid Mix in ml	2,7	3,3
Tris (1,5 M, pH 8,8) in ml	2,5	2,5
10% SDS in ml (sh. 4.1.10.1)	0,1	0,1
10% APS in ml	0,1	0,1
TEMED in µl	6	4

Sammelgel 5%	Acrylamid (30%, Mix 37,5:1)	0,85 ml
	Aqua bidest.	2,8 ml
	Tris HCl (0,5 mol/l, pH 6,8)	1,25 ml
	SDS-Lösung 10% (s. 4.1.10.1)	0,05 ml
	APS 10%	0,05 ml
	TEMED	5 µl
Laufpuffer	Tris	3,02 g
	Glycin	14,4 g
	SDS	1 g
	Aqua bidest.	ad 1000 ml
6-fach konz. Probenpuffer		
	SDS	1,2 g
	Glycerol	6 g
	DTT	0,93 g
	Bromphenolblau	6 mg
	0,5 M Tris HCl pH 6,8	1,2 ml
	Aqua bidest.	ad 10 ml

4.3.4 Transfer auf Nitrozellulosemembran

Nach Abtrennung des Sammelgels wurden die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm; Whatman, Dassel) übertragen. Der Protein-Transfer erfolgte für 75 Minuten bei einem konstanten Gleichstrom von 400 mA. Eine Quellung des Gels wurde durch das im Transferpuffer enthaltene Methanol verhindert. Um die übergegangenen Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurde diese für 5 Minuten mit Ponceau S Lösung gefärbt und bei Bedarf entsprechend geschnitten. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran mit TBST 0,1% gewaschen und zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Trockenmilchlösung für 60 Minuten inkubiert. Abhängig vom primären Antikörper wurde die Membran dreimal für

10 Minuten mit TBST gewaschen (Antikörper in TBST verdünnt) oder der primäre Antikörper wurde sofort zugegeben (Antikörper in Trockenmilchlösung verdünnt). Die verwendeten Antikörper und deren Arbeitsverdünnung sind in Tabelle 4-4 aufgeführt. Als Ladungskontrolle diente β -Actin. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C unter ständiger Bewegung. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 Minuten folgte die Inkubation mit dem in Trockenmilchlösung gelösten sekundären Antikörper. Dieser ist gegen den primären Antikörper gerichtet ist und mit der Peroxidase des Meerrettichs gekoppelt. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen und für 5 Minuten mit dem ECL + Western Blot Detektions-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert, das ein Substrat der Peroxidase enthält und nach Umsetzung eine Chemilumineszenz zeigt. Zur Visualisierung wurden Filme (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in Abhängigkeit der Lumineszenz für 2 Sekunden bis 60 Minuten belichtet und sofort entwickelt (Hyperprocessor, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Der entwickelte Film wurde eingescannt und mit der Auswertesoftware Multi Analyst (Bio Rad, München) computergestützt ausgewertet.

Tabelle 4-4: Liste der verwendeten Antikörper für den Western Blot mit Arbeitsverdünnung und Hersteller

	Zielantigen	Verdünnung	Hersteller
Primärantikörper (Maus)	Nestin	1:1000 (in TBST gelöst)	Chemicon
	β -Actin	1:40.000 (in Trockenmilch gelöst)	Santa Cruz
Sekundärantikörper	Primärantikörper (Maus)	Nestinnachweis: 1:5000 β -Actinnachweis: 1:20.000	Dako

Transferpuffer	Tris	3,025 g
	Glycin	14,4 g
	Methanol	200 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

TBS (10-fach konz.)	Tris	242,3 g
	Natriumchlorid	175,3 g
	Aqua bidest.	ad 2000 ml
	mit Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt	
TBST 0,1%	TBS (10-fach konz.)	100 ml
	Tween 20	1 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml
Trockenmilch-Lösung	Magermilchpulver	5 g
	TBST 0,1 %	ad 100 ml

4.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung (T-Test) erfolgte computergestützt mit dem Programm Excel (Microsoft, Redmond, USA)

4.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Absaugpumpe Vacusafe	Integra Biosciences, Zürich (CH)
Deckgläser 15 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Elektrophoresekammer	Peqlab, Erlangen
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster
Gefrier Röhrchen	Lab-Tek, Christchurch (NZ)
Gelschlitten mit Kamm	Biomed, Oberschleißheim
Kanülen	B.Braun, Melsungen
Magnetrührgerät MR 3002	Heidolph, Schwabach
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss, Jena
Neubauer Zählkammer	Feinoptik Bad Blankenburg
Objektträger SuperFrost	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago (USA)
Pasteurpipetten 230 mm	Karl Hecht, Sondheim
Petrischalen 6 cm und 10 cm	Greiner bio-one, Kremsmünster
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pinzetten	Carl Roth, Karlsruhe
Pipette 10 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster
Pipette 10 ml mit weiter Auslassöffnung	BD Biosciences, Bedford (USA)
Pipetten	Lab-Systems, Virginia (USA)
Pipettenspitzen Filtertip	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy	Greiner bio-one, Kremsmünster
Präparierscheren	Integra Biosciences, Fernwald
Spannungsgerät (Elektrophorese)	Carl Roth, Karlsruhe
Spannungsgerät (Western Blot)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektrometer	Bio Rad, München
Spritzen	Bio Rad, München
Spritzenfilter 0,22 µm	B.Braun, Melsungen
Standard Eppendorf Tubes	Carl Roth, Karlsruhe
Sterilbank	Eppendorf, Hamburg
	Holten Lamin Air, Allerød (DK)

Stickstofftank	Messer, Krefeld
Tiefkühltruhe -20 °C	Liebherr, Biberach
Tiefkühltruhe -80 °C	ThermoForma, Marietta (USA)
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Waage BP 210 S	Sartorius, Göttingen
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Western Blot Apparatur	Bio Rad, München
Zellkulturflaschen 250 ml	BD Biosciences, Bedford (USA)
Zellkulturflaschen 50 ml	Nunclon, Roskilde (DK)
Zellkulturflaschen 650 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster
Zellkulturschalen Falcon	BD Biosciences, Bedford (USA)
Zellsiebe (40 µm, 70 µm)	BD Biosciences, Bedford (USA)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

Stammzellklon

Embryonaler Mausstammzellklon R1 (Nagy et al. 1993)

4.6 Chemikalien

2-Mercaptoethanol (50 mM, 1000x)	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid (30%, Mix 37,5:1)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Adenosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aprotinin	Applichem, Darmstadt
APS	Applichem, Darmstadt
Aqua bidest.	Fresenius Kabi, Bad Homburg
B27 Supplement (50x)	Invitrogen, Karlsruhe
BDNF	PeptoTech, Hamburg
Borax	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytidine	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM	
<i>(high glucose, with pyruvate)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM	
<i>(high glucose, no pyruvate, 25 mM HEPES)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM	
<i>(high glucose, no pyruvate, with glutamax)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol 70%	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol Absolute	J.T.Baker, Deventer (NL)
FCS (ES-qualified)	PAA Gold, Paschin (A)
Fibronektin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gelatine 2% (bovin)	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutamin (200 mM, 100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Guanosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
HBSS (ohne Ca und Mg)	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Applichem, Darmstadt
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laminin	Sigma-Aldrich, Steinheim
LIF (murin, 10 ⁷ U/ml, ESGRO)	Millipore, Billerica (USA)
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MEM	Invitrogen, Karlsruhe
MEM/NEAA (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Mitomycin C	Invitrogen, Karlsruhe
N2-Supplement	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe

Natriumflourid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Natronlauge	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neurobasalmedium	Invitrogen, Karlsruhe
NGF	PeproTech, Hamburg
NT3	PeproTech, Hamburg
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS (ohne Ca und Mg)	Invitrogen, Karlsruhe
Pen/Strep (5000 IU Penicillin, 5000 µg Streptomycin/ml, 100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum (<i>Horse serum</i> , hitzeinaktiviert)	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-D-Lysine hydrobromide	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysine hydrobromide	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Progesteron	Sigma-Aldrich, Steinheim
ProLong Gold antifade reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Putrescine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thymidine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin aus Rinderpankreas	Applichem, Darmstadt
Trypsin/EDTA 0,05%	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA 0,25%	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Bio Rad, München
Uridin	Sigma-Aldrich, Steinheim

5 Ergebnisse

5.1 Kultur embryonaler Stammzellen

Die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) vom R1 Klon der Maus wurden als Co-Kultur in direktem Kontakt mit einer Zellschicht aus embryonalen Mausfibroblasten (MEF-Zellen) kultiviert. Sie bildeten in deren Zellnischen scharf abgrenzbare bohnenförmige Kolonien, die zunehmend an Größe gewannen (Abbildung 5-1). Durch den von den MEF-Zellen gebildeten und exogen zugegebenen Wachstumsfaktor *leukaemia inhibitory factor* (LIF; Smith et al. 1988, Williams et al. 1988) wurde die Ausdifferenzierung der ES-Zellen verhindert. Eine Konfluenz der ES-Zellkolonien oder ein zu später Mediumwechsel, der zu einer Übersäuerung des Mediums führte, musste vermieden werden, da dies einen Verlust der Pluripotenz und eine vorzeitige Ausdifferenzierung der ES-Zellen zur Folge hatte. Ein Verlust der scharfen Begrenzungen und die Bildung von Ausläufern der runden ES-Zellkolonien zeigten eine solch vorzeitige Ausdifferenzierung an.

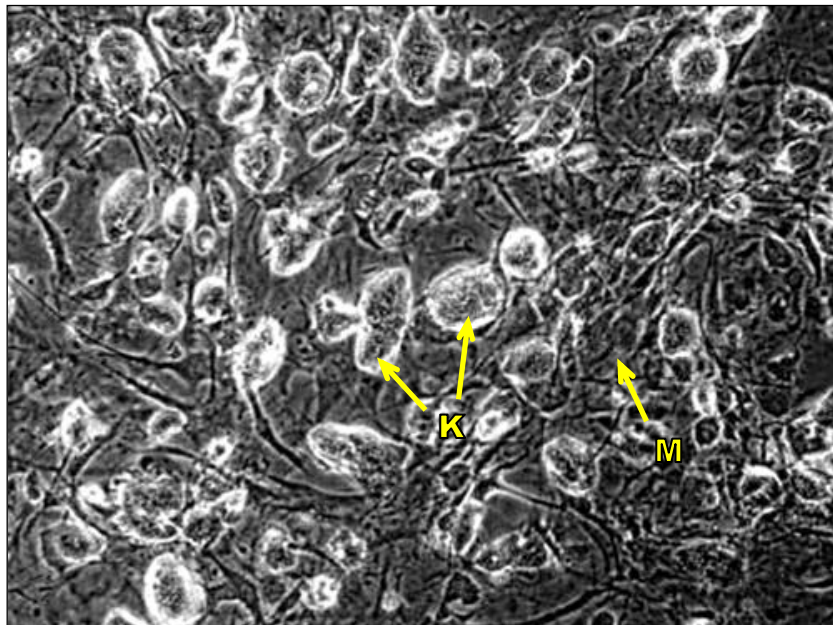


Abbildung 5-1: Kolonien von ES-Zellen (K) auf MEF-Zellen (M).

5.2 Differenzierung embryonaler Stammzellen in Neurone

5.2.1 Bildung von Embryoidkörperchen

Durch den Entzug des exogen zugegebenen Wachstumsfaktors LIF und der Trennung der ES-Zellen von den MEF-Zellen wurde die Differenzierung der ES-Zellen ausgelöst. Die Differenzierung der ES-Zellen ging mit der Bildung der sogenannten Embryoidkörperchen einher. Diese unterschieden sich von unregelmäßigen losen Stammzellclustern durch die scharf abgrenzbare und dicht gepackte Kugelform und erinnerten am ehesten an eine Blastozyste. Die Bildung der Embryoidkörperchen konnte sowohl über eine Suspensionskultur, als auch über eine Kultur im hängenden Tropfen erfolgen. Wurde die Bildung der Embryoidkörperchen als Suspension in nicht-adhäsiven bakteriologischen Petrischalen angestrebt, durfte vorher keine vollständige Vereinzelung der ES-Zellen erfolgen. Embryoidkörperchen bildeten sich nur aus zusammenhängenden Zellclustern. Eine zu starke Vereinzelung führte zum Absterben der ES-Zellen mit einer geringeren Ausbeute an Embryoidkörperchen. Als optimal erwies sich eine Zellsuspension mit Zellclustern von 10 - 20 Zellen. Bei der Erzeugung von Embryoidkörperchen durch Kultur im hängenden Tropfen, war dagegen die vollständige Vereinzelung der ES-Zellen erforderlich. Die Zellen eines jeweiligen Tropfens folgten der Schwerkraft und sammelten sich am unteren Pol des Tropfens. Sie wurden so in enge räumliche Nähe gebracht, so dass sich im weiteren Verlauf der Kultur jeweils ein Embryoidkörperchen in jedem Tropfen bildete (Abbildung 5-2). Durch die festgelegte Zellzahl in den Tropfen entstanden Embryoidkörperchen von konstanter Größe und Zellzahl. Aufgrund der einheitlichen Embryoidkörperchengröße wurde die Kultur im hängenden Tropfen bevorzugt.

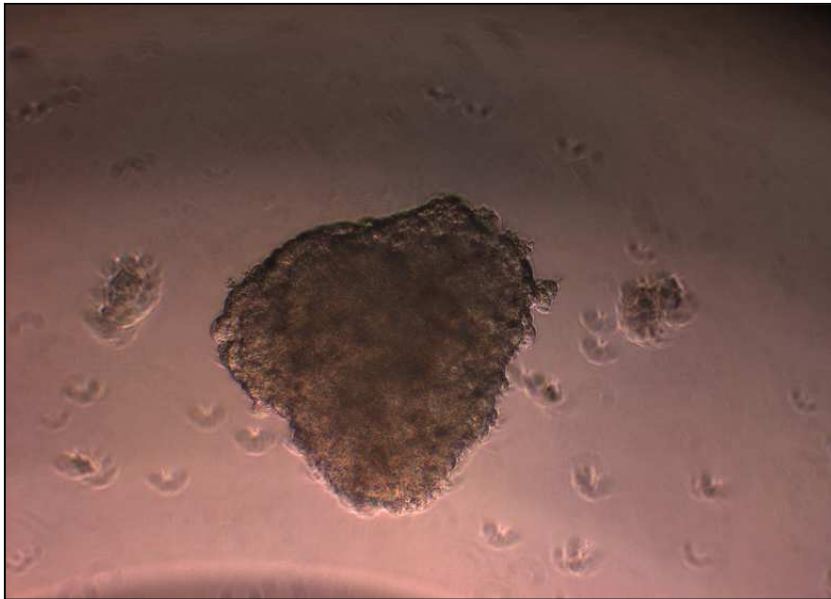


Abbildung 5-2: Embryoidkörperchen eines hängenden Tropfens (Tag 4).

Die Embryoidkörperchen waren bereits nach zweitägiger Kultur in Suspension und im hängenden Tropfen mikroskopisch erkennbar. Sie waren zunächst klein und unregelmäßig geformt, durch die typische Morphologie jedoch gut identifizierbar (Abbildung 5-3 links). Die Embryoidkörperchen gewannen kontinuierlich an Größe. Nach ungefähr sechs Tagen in Kultur waren sie bereits mit dem bloßen Auge sichtbar. Wurden die Embryoidkörperchen jedoch zu groß, so kam es durch die zunehmende Diffusionsstrecke und den dadurch bedingten Mangel an Nährstoffen zur Nekrose der innersten Zellen, die sich im Mikroskop als zentrale dunkle Färbung zeigte (Abbildung 5-3 rechts).

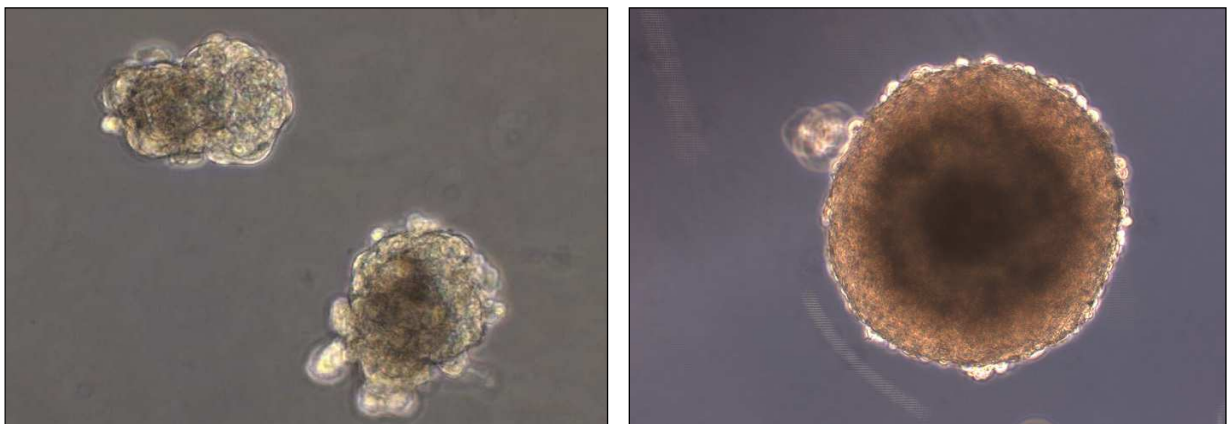


Abbildung 5-3: Zwei Tage alte Embryoidkörperchen in Suspensionskultur (links); Embryoidkörperchen mit zentraler Nekrose nach zu langem Wachstum (rechts).

Zu Beginn der Etablierung erfolgte noch keine Trennung der MEF-Zellen von den ES-Zellen. Dies führte zu einer beeinträchtigten Bildung der Embryoidkörperchen und der späteren Differenzierung. Es entstanden hierbei keine oder nur sehr kleine und unregelmäßig geformte Embryoidkörperchen. Durch die Trennung der ES-Zellen von den MEF-Zellen mit Hilfe mehrerer Sedimentationsschritte (Oyamada et al. 1996) konnte das Mengenverhältnis beider Zellarten zu Gunsten der ES-Zellen verschoben werden. Der Erfolg dieser Maßnahme zeigte sich in einem reproduzierbaren Wachstum und einer regelmäßigeren Morphologie der Embryoidkörperchen beider Herstellungsverfahren.

Das Wachstum und die Bildung der Embryoidkörperchen wurden nicht nur von den MEF-Zellen beeinflusst, sondern auch von der Wahl eines geeigneten Grundmediums. Zunächst wurde für die Bildung der Embryoidkörperchen ein Medium aus DMEM (*high glucose, no pyruvate, with glutamax*) verwendet, das mit 20% fetalem Kälberserum (FCS) versetzt war. Hiermit konnten nach vier Tagen Suspensionskultur nur wenig und sehr kleine Embryoidkörperchen gefunden werden. Der Großteil der Zellen starb ab. Durch die Verwendung eines dem Stammzellproliferationsmedium (Proliferationsmedium, siehe 4.1.3) ähnlichen Differenzierungsmediums, allerdings ohne Zugabe des die Differenzierung hemmenden Wachstumsfaktors LIF und nur mit 10% fetalem Kälberserum (Differenzierungsmedium, siehe 4.1.5.1) konnte eine deutliche Verbesserung des Wachstums und der Größe der Embryoidkörperchen erreicht werden. Die diesem Medium zugesetzten Substanzen, wie z.B. Glutamin, Aminosäuren, Nukleoside, 2-Mercaptoethanol und HEPES, waren für das Wachstum der Embryoidkörperchen essentiell.

5.2.2 Gerichtete Differenzierung

5.2.2.1 Einfluss von Retinsäure auf die neuronale Differenzierung

ES-Zellen differenzieren während der Bildung der Embryoidkörperchen spontan und zufällig in viele unterschiedliche Zellarten. Durch die Zugabe von all-trans-Retinsäure kann die Differenzierung jedoch zu Gunsten der neuronalen Vorläuferzellen

verschoben werden. Ausschlaggebend für das Ausmaß der neuronalen Differenzierung sind dabei der Zeitpunkt und die Konzentration der zugegebenen Retinsäure (Jones-Villeneuve et al. 1982, Bain et al. 1995, Fraichard et al. 1995, Rohwedel et al. 1999). Um zu überprüfen, welche Retinsäurekonzentration die neuronale Differenzierung in dieser Arbeit am effektivsten fördert, wurden die Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Retinsäure behandelt. Zur Kontrolle wurden außerdem Kulturen ohne Retinsäurebehandlung herangezogen. Die Zugabe von Retinsäure in den Konzentrationen 5×10^{-8} , 1×10^{-7} und 5×10^{-7} mol/l erfolgte unmittelbar nach Entzug von LIF am Tag 0 der Bildung der Embryoidkörperchen für zwei Tage. Am Tag 8 der Bildung der Embryoidkörperchen erfolgte die Lyse der Embryoidkörperchen, um mittels Western Blot die Konzentration von Nestin, dem Markerprotein neuronaler Vorläuferzellen (Frederiksen und McKay 1988, Lendahl et al. 1990, Gilyarov 2008), zu bestimmen. Der Vergleich der unterschiedlichen Retinsäurekonzentrationen ergab einen Trend zu einer maximalen Nestinkonzentration bei einer Konzentration von 5×10^{-7} mol/l ($p > 0,05$, Abbildung 5-4 links). Im Bezug auf Embryoidkörperchen, die ohne Zugabe von Retinsäure kultiviert wurden, konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der Nestinkonzentration durch Zugabe von Retinsäure in einer Konzentration von 5×10^{-7} mol/l erreicht werden ($p < 0,001$, Abbildung 5-4 rechts).

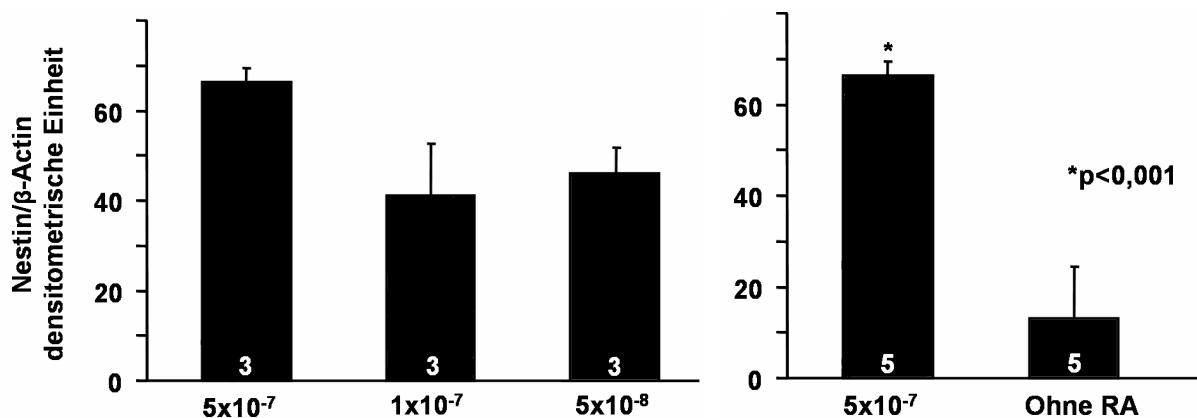


Abbildung 5-4: Konzentration von Nestin in Embryoidkörperchen in Abhängigkeit von der Retinsäurekonzentration. Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung, wobei die Ordinate jeweils den Gehalt an Nestin in Bezug auf β -Actin als Beladekontrolle in densitometrischen Einheiten angibt. Auf der x-Achse sind die untersuchten Retinsäure (RA)-Konzentrationen (mol/l) angegeben. Die Zahlen in den Balken entsprechen der untersuchten Anzahl an Proben.

5.2.2.2 Einfluss von fetalem Kälberserum auf die neuronale Differenzierung

Die Bestimmung des Einflusses von Retinsäure auf die neuronale Differenzierung wurde im Differenzierungsmedium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) durchgeführt. Um zu überprüfen, ob eine unterschiedliche FCS-Konzentration ebenfalls einen Einfluss auf die neuronale Differenzierung hat und ob sich der Anteil an Nestin positiven Zellen dadurch noch steigern lässt, wurden Embryoidkörperchen mit einer FCS-Konzentration von 2%, 5% und 10% sowie Zusatz von Retinsäure (5×10^{-7} mol/l während der ersten beiden Tage) im Differenzierungsmedium kultiviert. Nach 8 Tagen wurden die Embryoidkörperchen aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten lysiert und die Nestinkonzentration mittels Western Blot bestimmt. Die in 2% und 5% FCS kultivierten Embryoidkörperchen zeigten eine signifikant höhere Nestinkonzentration gegenüber den in 10% FCS kultivierten Embryoidkörperchen. Die höchste Nestinkonzentration wurde bei einer Konzentration von 5% FCS gemessen (Abbildung 5-5). Allerdings ging die niedrigere FCS-Konzentration im Differenzierungsmedium mit einer niedrigeren absoluten Anzahl und einer geringeren Größe der Embryoidkörperchen einher (Abbildung 5-6).

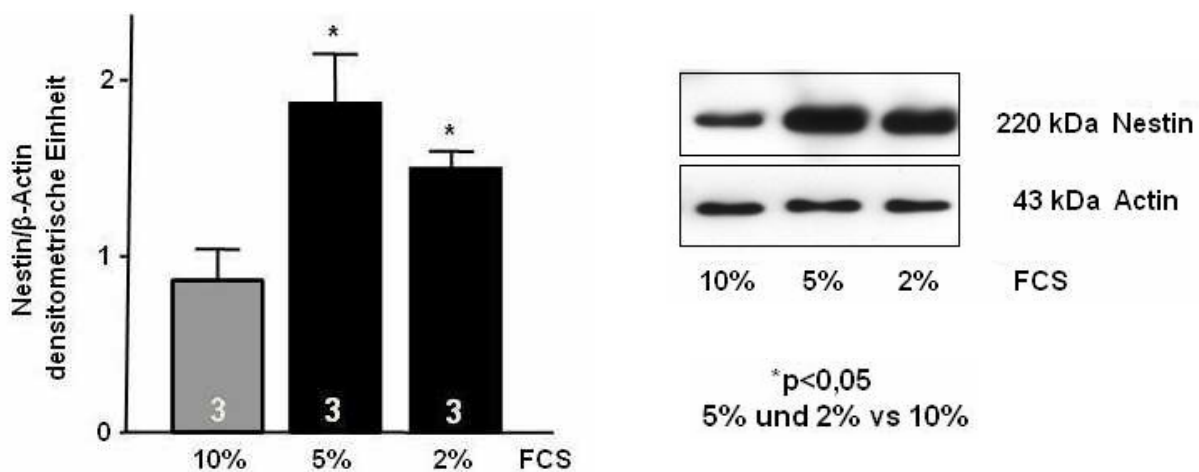


Abbildung 5-5: Konzentration von Nestin in Embryoidkörperchen in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration. Die Abbildung zeigt links die statistische Auswertung, wobei die Ordinate den Gehalt an Nestin in Bezug auf β-Actin als Beladekontrolle in densitometrischen Einheiten angibt. Auf der x-Achse sind die untersuchten FCS-Konzentrationen angegeben. Die Zahlen in den Balken entsprechen der untersuchten Anzahl an Proben. Rechts im Bild ist exemplarisch ein zugehöriger Western Blot dargestellt. Die Höhe und das Molekulargewicht des dabei mitgeführten Proteinstandards sind ganz rechts angegeben.

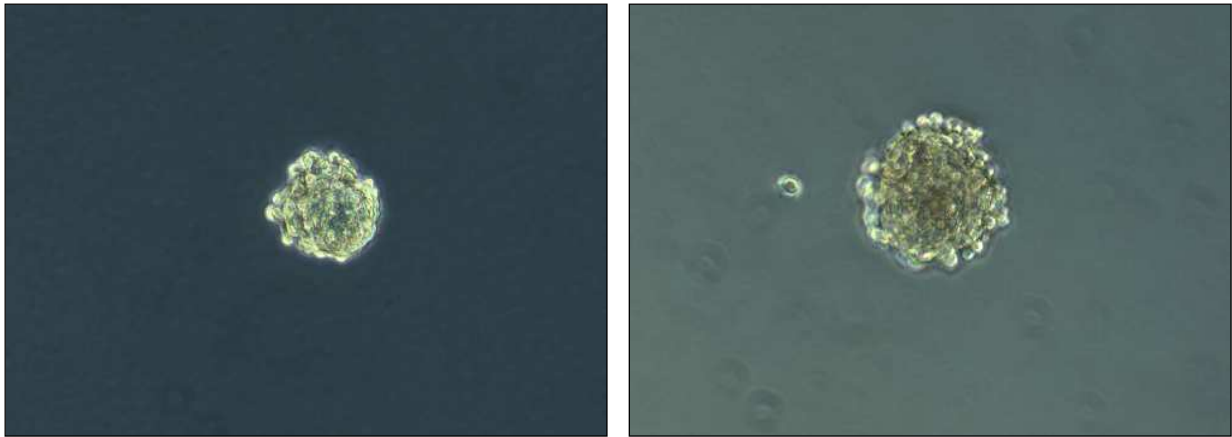


Abbildung 5-6: Embryoidkörperchen im Differenzierungsmedium mit 2% FCS (links); Embryoidkörperchen im Differenzierungsmedium mit 10% FCS nach gleicher Kulturdauer von 4 Tagen (rechts).

5.3 Selektion neuronaler Vorläuferzellen

Um eine möglichst reine Kultur von neuronalen Vorläuferzellen beziehungsweise Neurone zu bekommen, wurde versucht, mittels eines Selektionsmediums nicht-neuronale Zellen zu entfernen. Das in Anlehnung an das Protokoll von Okabe et al. (1996) verwendete insulin-, transferrin- und selenithaltige Selektionsmedium (ITS-Medium, siehe 4.1.7) stellte ein serumfreies Mangelmedium dar, das selektiv das Überleben neuronaler Vorläuferzellen begünstigen sollte.

Für die Selektion Nestin positiver neuronaler Vorläuferzellen wurden die Embryoidkörperchen nach 8 Tagen in Suspension auf gelatinebeschichteten Zellkulturschalen ausplattiert. Innerhalb von 24 Stunden hatten sich nahezu alle Embryoidkörperchen angeheftet, so dass das bis dahin verwendete Medium durch das ITS-Medium ersetzt werden konnte. Die angehefteten Embryoidkörperchen flachten ab und begannen, sich am Schalenboden auszubreiten. Die in der Randzone der Embryoidkörperchen gelegenen Zellen wanderten in die Peripherie und bildeten eine einlagige Schicht sich differenzierender Zellen, während in der zentralen Zone mehrere Zelllagen erhalten blieben. Bereits ab Beginn der Kultur der Zellen mit ITS-Medium kam es zu einer starken Zellablösung, die das Absterben zahlreicher Zellen anzeigte. Zunächst waren sehr unterschiedliche Zelltypen

vorherrschend, die anhand der Morphologie keine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Zellart zuließen (Abbildung 5-7).

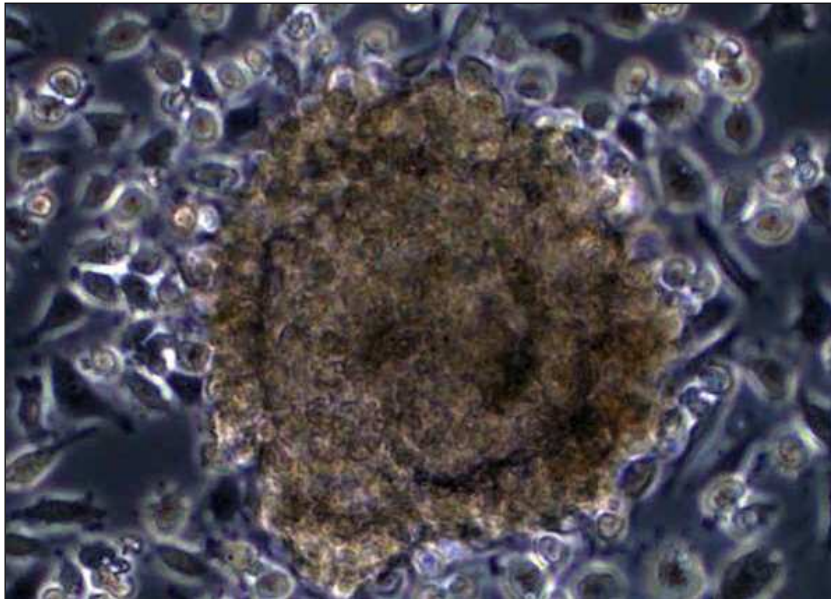


Abbildung 5-7:
Embryoidkörperchen nach
Anheftung und Ausbrei-
tung auf der Zell-
kulturfläche

Nach ungefähr 3 Tagen waren in der Randzone der ausgebreiteten Embryoidkörperchen erste potentielle neuronale Vorläuferzellen mit überwiegend zwei (bipolar) und seltener mehreren (multipolar) Ausläufern lichtmikroskopisch zu erkennen. Die Länge dieser Ausläufer nahm über die Zeit kontinuierlich zu. Die Somata dieser Zellen waren durch ein typisches Leuchten unter dem Lichtmikroskop gekennzeichnet (Abbildung 5-8, Abbildung 5-9, Abbildung 5-10). Diese Zellen zeigten eine höhere Überlebensrate im ITS-Medium. Während der Selektion überlebten zunächst auch andere Zellpopulationen, so dass neben den neuronähnlichen Zellen Zellverbände von grundlegend anderer Morphologie zu finden waren. Beispielsweise kam es zu Beginn der Selektion in einigen der ausgebreiteten Embryoidkörperchen zur Differenzierung von Herzmuskelzellen, die durch ihre rhythmischen Kontraktionen lichtmikroskopisch identifiziert wurden (Abbildung 5-11). Nach 5 - 7 Tagen weiterer Kultur im FCS-freien ITS-Selektionsmedium kam es jedoch zum Absterben der Herzmuskelzellen. Bei einer Kulturdauer von 9 Tagen im ITS-Medium wurde lichtmikroskopisch die beste Selektionswirkung für neuronale Vorläuferzellen bei ausreichender absoluter Zellzahl beobachtet.

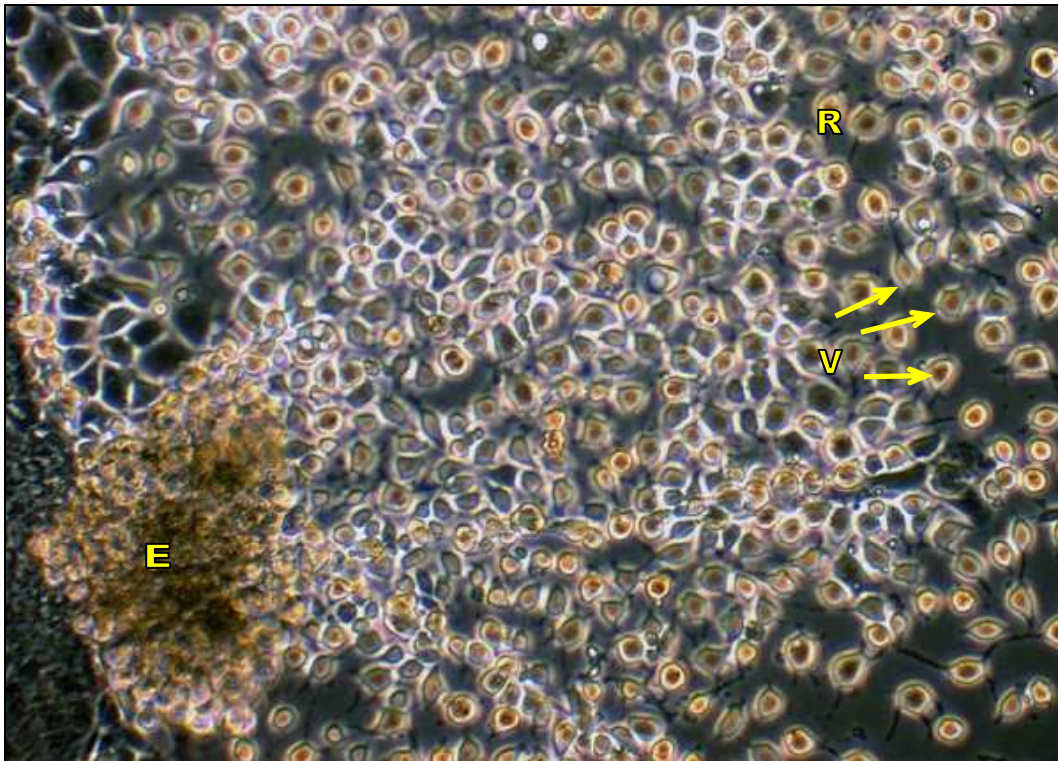


Abbildung 5-8: Randzone (R) eines Embryoidkörperchens (E) mit verschiedenen bi- und multipolaren neuronalen Vorläuferzellen (V) nach 5 Tagen unter ITS-Medium.

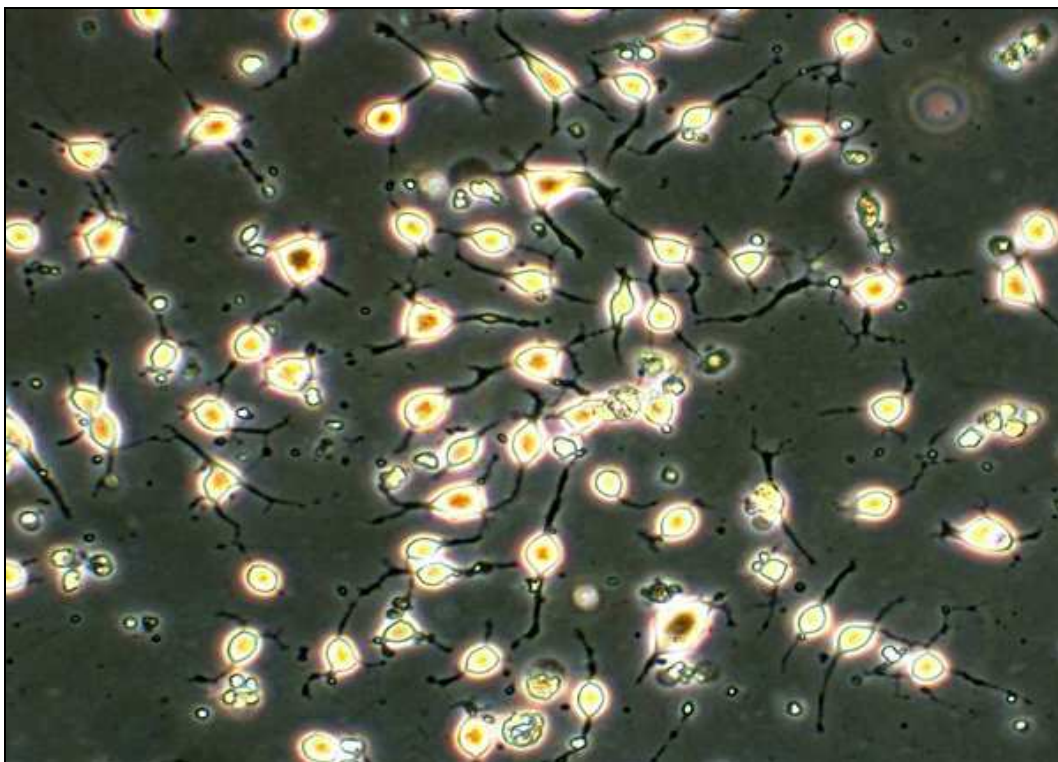


Abbildung 5-9: Bi- und multipolare neuronale Vorläuferzellen in der Randzone eines Embryoidkörperchens nach 5 Tagen unter ITS-Medium. Vergrößerter Bildausschnitt.

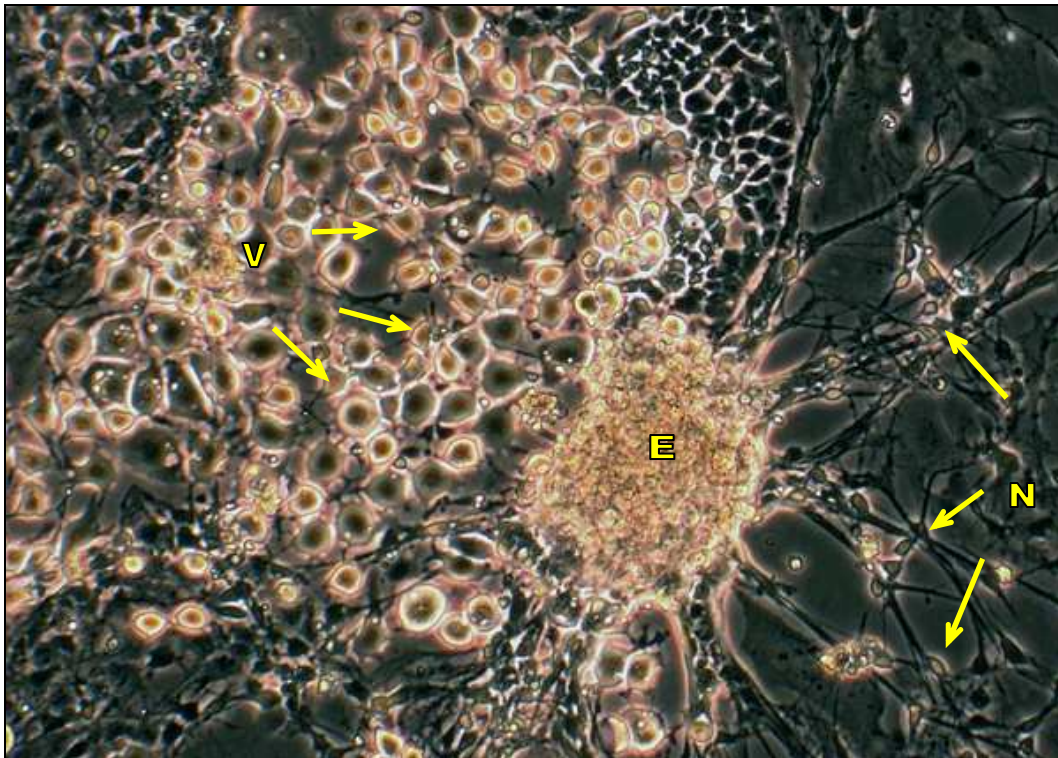


Abbildung 5-10: Embryoidkörperchen (E) nach 8 Tagen unter ITS-Medium mit neuronalen Vorläuferzellen (V) und neuronenähnlichen Zellen mit synaptischen Zell-Zell-Kontakten (N).

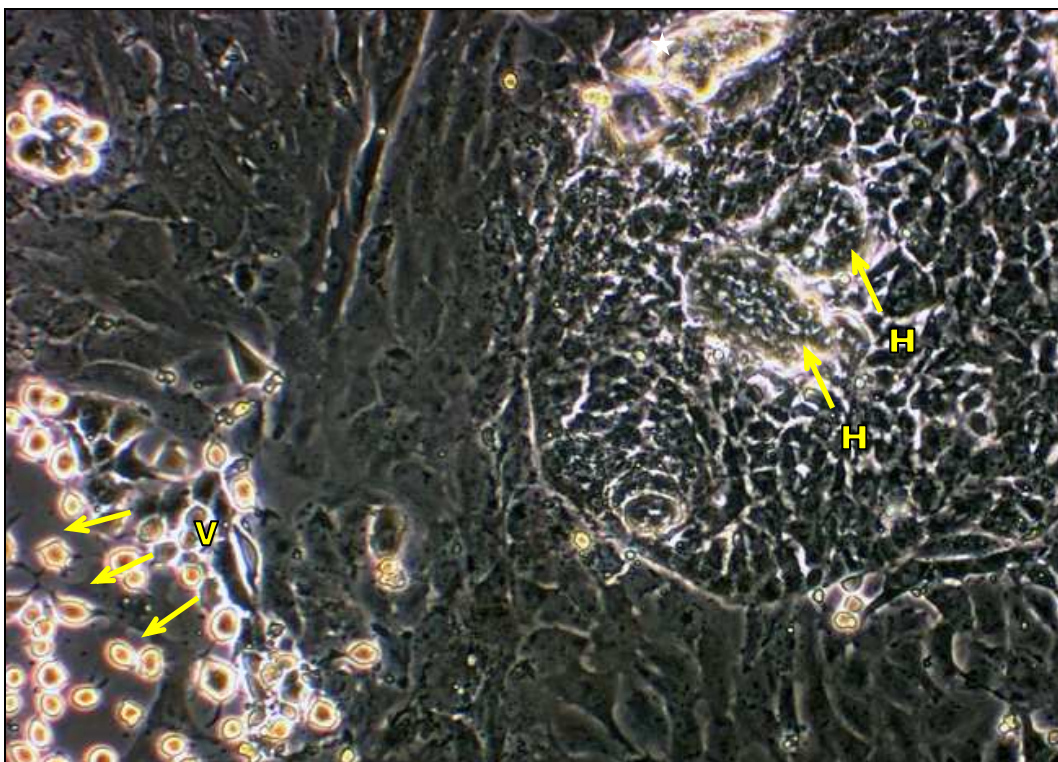


Abbildung 5-11: Embryoidkörperchen nach 4 Tagen unter ITS-Medium. Kontrahierende Zellverbände von Herzmuskelzellen (H) und neuronale Vorläuferzellen (V).

5.4 Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen

Nach Beendigung des Selektionsvorganges im ITS-Medium wurden die verbleibenden Zellen für die sich anschließende Differenzierung in postmitotische Neurone abgelöst und auf beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Der Tag der Aussaat der Zellen wird im Folgenden als Tag 0 bezeichnet. Nach der Anheftung bildete ein Großteil der Zellen innerhalb von 24 Stunden zunächst zwei Ausläufer, so dass auch hier zu Beginn der bipolare Zelltyp vorherrschte. Die Ausläufer einiger dieser Zellen wuchsen kontinuierlich weiter und verzweigten sich. Das charakteristische „Leuchten“ dieser potentiellen neuronalen Zellen im Lichtmikroskop blieb erhalten. Teilweise trafen die Ausläufer verschiedener Zellen aufeinander, so dass der Eindruck synaptischer Kontakte entstand (Abbildung 5-12, Abbildung 5-13). Innerhalb von ungefähr 7 Tagen ist die für Neurone typische Morphologie dieser Zellen manifest geworden. Die Zellen mit nicht-neuronaler Morphologie schienen dabei unter den Zellen mit neuronaler Morphologie lokalisiert zu sein.

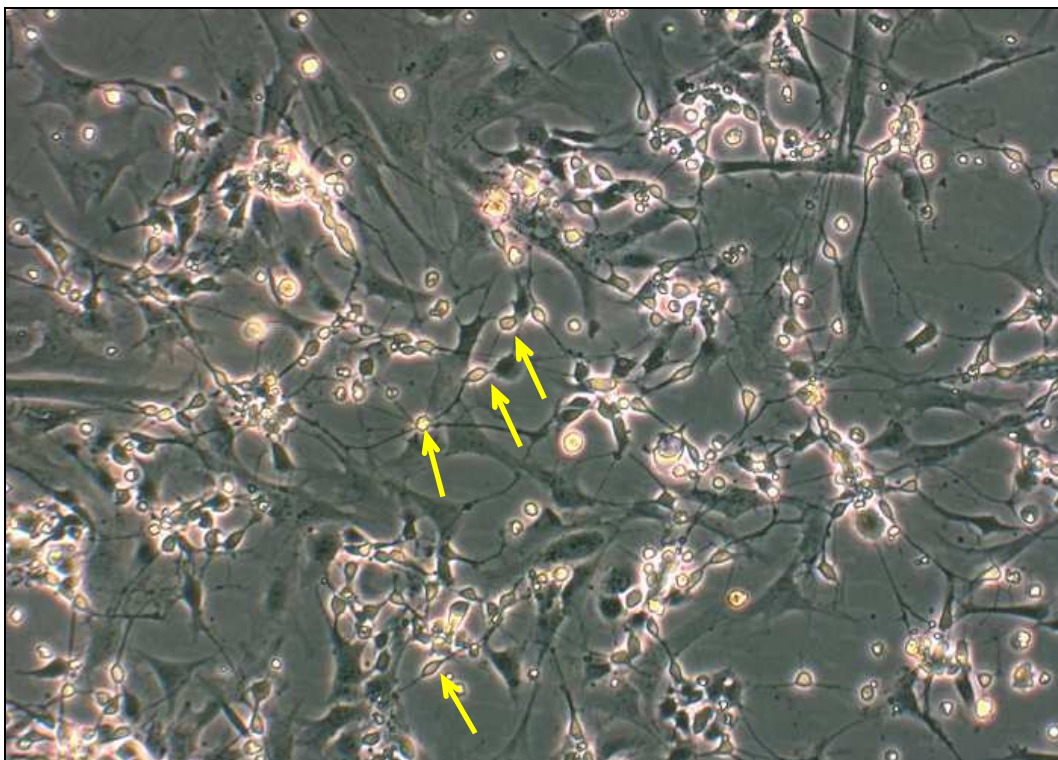


Abbildung 5-12: Aus ES-Zellen differenzierte Zellen mit neuronentypischer Morphologie (Pfeile), Tag 2 nach Aussaat auf Deckgläschen.

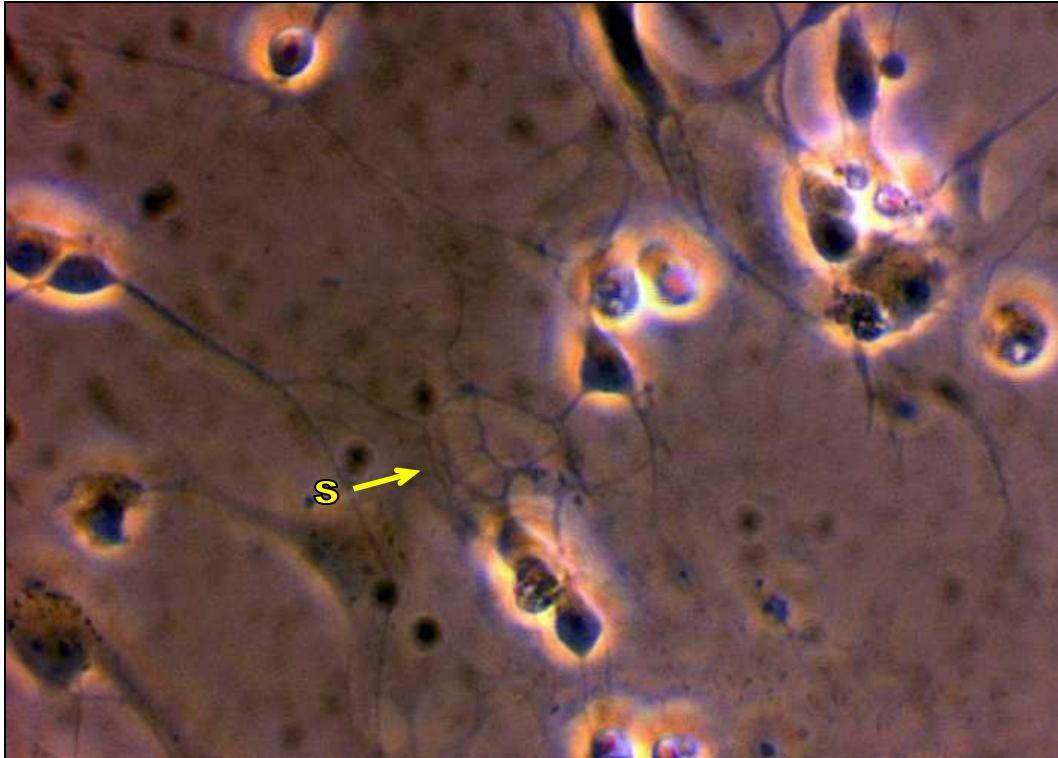


Abbildung 5-13: Aus ES-Zellen differenzierte Zellen mit neuronentypischer Morphologie. Tag 2 nach Aussaat auf Deckgläschen. Vergrößerte Ansicht der Ausläufer mit synaptischen Kontakten (S).

Als Referenz für die morphologische Beurteilung der aus ES-Zellen differenzierten Neurone wurden Primärneurone aus den Hippocampi embryonaler Mäuse herangezogen. Unter diesen Referenzzellen ließen sich bereits in den frühen Entwicklungsstadien von wenigen unspezifischen Zellen morphologisch die Neurone abgrenzen. Sie entwickelten sich aus bi- und multipolaren Zellen, aus denen im Laufe des weiteren Wachstums jeweils mehrere lange dünne Ausläufer hervorgingen (Abbildung 5-14).

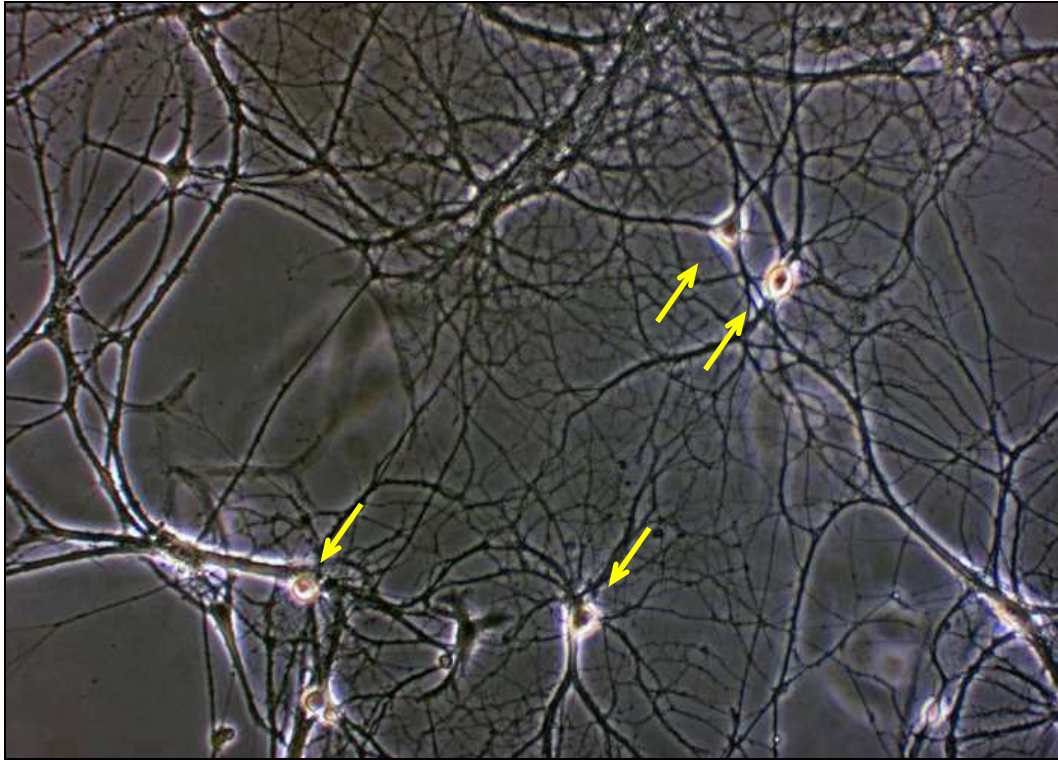


Abbildung 5-14: Primärneurone (Pfeile) als Referenz nach 14 Tagen in Gliazell-Co-Kultur.

Um die optimalen Differenzierungsbedingungen der neuronalen Vorläuferzellen zu ermitteln, wurden verschiedene Kulturverfahren im Vergleich ausgetestet. Durch die Kultur neuronaler Vorläuferzellen eines Versuchsansatzes in verschiedenen Medien wurde das optimale Medium ermittelt. Im Vergleich mit N2-Medium (Neurobasalmedium und N2-Supplement, Invitrogen, Karlsruhe) und B27-Medium (Neurobasalmedium und B27-Supplement, Invitrogen, Karlsruhe) zeigten sich die besten Kulturergebnisse im N3-Medium nach Okabe et al. (1996). Im Gegensatz zu einer starken Ablösung der Zellen in den anderen Medien blieb hier eine ausreichende Zahl an neuronalen Zellen für die Langzeitkultur bestehen. Durch Vorinkubation des N3-Medium über Gliazellen 24 Stunden vor Verwendung wurden diese Ergebnisse weiter verbessert.

Einflüsse auf die Differenzierung und das Wachstum der Neurone übte nicht nur das Nährmedium sondern auch die Beschichtung der Deckgläschen aus. Die zusätzlich zur Poly-L-Lysinbeschichtung aufgebraachte Lamininbeschichtung führte zu einer verbesserten Anheftung der neuronalen Vorläuferzellen und zu einer Förderung der neuronalen Differenzierung. Durch die Zugabe der neurotrophen Faktoren *brain-*

derived neurotrophic factor (BDNF, Barde et al. 1982), *nerve growth factor* (NGF, Cohen und Levi-Montalcini 1956) und *neurotrophin 3* (NT3, Maisonpierre et al. 1990, Mattson 2008) zum Nährmedium konnte das Überleben der neuronalen Zellen verlängert werden.

Um ein möglichst langes Überleben der aus ES-Zellen differenzierten Neurone *in vitro* zu erreichen, wurden die Zellen in die kontaktlose Co-Kultur mit Gliazellen überführt und das N3-Medium schrittweise gegen Neuronenmedium I (siehe 4.1.8.3) ausgetauscht. Unter diesen Bedingungen war es möglich, die aus den neuronalen Vorläuferzellen differenzierten und zunächst anhand morphologischer Kriterien identifizierten Neurone bis zu 38 Tage *in vitro* zu kultivieren (Abbildung 5-15).

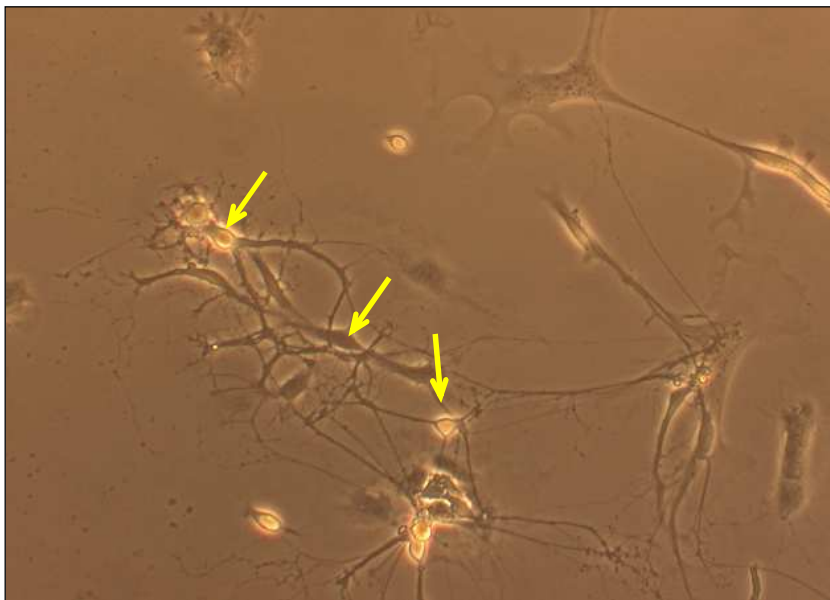


Abbildung 5-15: Neurone (Pfeile) aus ES-Zellen nach 38 Tagen in kontaktloser Gliazell-Co-Kultur.

Die für die kontaktlose Co-Kultur mit Gliazellen erforderliche Teilungsinhibition der Gliazellen wurde zunächst mit Cytosinarabinosid (Konzentration 1 mM) durchgeführt, das die Replikation der DNA für die Zellteilung blockiert. Dieses Verfahren erwies sich jedoch als unzureichend, da es dennoch zu einem Überwuchern der Gliazellen kam. Daher wurde auf die Methode der Teilungsinhibition der Gliazellen mit Mitomycin vor Beginn der Gliazell-Co-Kultur zurückgegriffen, die bereits für die MEF-Zellen beschrieben wurde (siehe 4.1.2).

5.5 Immunzytologie

5.5.1.1 Immunzytologische Charakterisierung der Embryoidkörperchen

Für die immunzytologische Charakterisierung der aus ES-Zellen differenzierten Zellen kamen Primärantikörper gegen die neuronenspezifischen Markerproteine β 3-Tubulin, Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP 2), Neurofilament 68 kD, Neurofilament 200 kD (NFL 68 und NFL 200) und Synaptophysin zum Einsatz. Neuronale Vorläuferzellen wurden mit Antikörpern gegen das Markerprotein Nestin angefärbt. Mit Hilfe des gliazellspezifischen Antigens *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) wurden Gliazellen immunzytologisch identifiziert.

Einige 8 Tage alte Embryoidkörperchen, die in Suspension kultiviert wurden und deren Differenzierungsmedium während der ersten beiden Tage Retinsäure (Konzentration 5×10^{-7} mol/l) und 5% FCS enthielt, wurden auf beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Eine Selektion mit Hilfe des ITS-Selektionsmediums erfolgte dabei nicht. Die Embryoidkörperchen hefteten sich an und die Zellen breiteten sich aus. Nach 3 - 5 Tagen wiesen die Zellen in der Peripherie des Embryoidkörperchens dünne Ausläufer auf. Es handelte sich überwiegend um Zellen vom bipolaren Typ. Die Zellen in der direkten Randzone des ausplattierten Embryoidkörperchen konnten mit Antikörpern gegen das Markerprotein Nestin angefärbt werden. Etwas weiter außen liegende Zellen wurden erfolgreich mit Antikörpern gegen β 3-Tubulin angefärbt (Abbildung 5-16 A, B). Nach einigen weiteren Tagen in Kultur hatten diese Ausläufer an Größe gewonnen und es konnte zusätzlich das Markerprotein Neurofilament 68 kD (NFL 68) nachgewiesen werden, durch das die Axone von Neuronen gekennzeichnet sind (Abbildung 5-16 C).

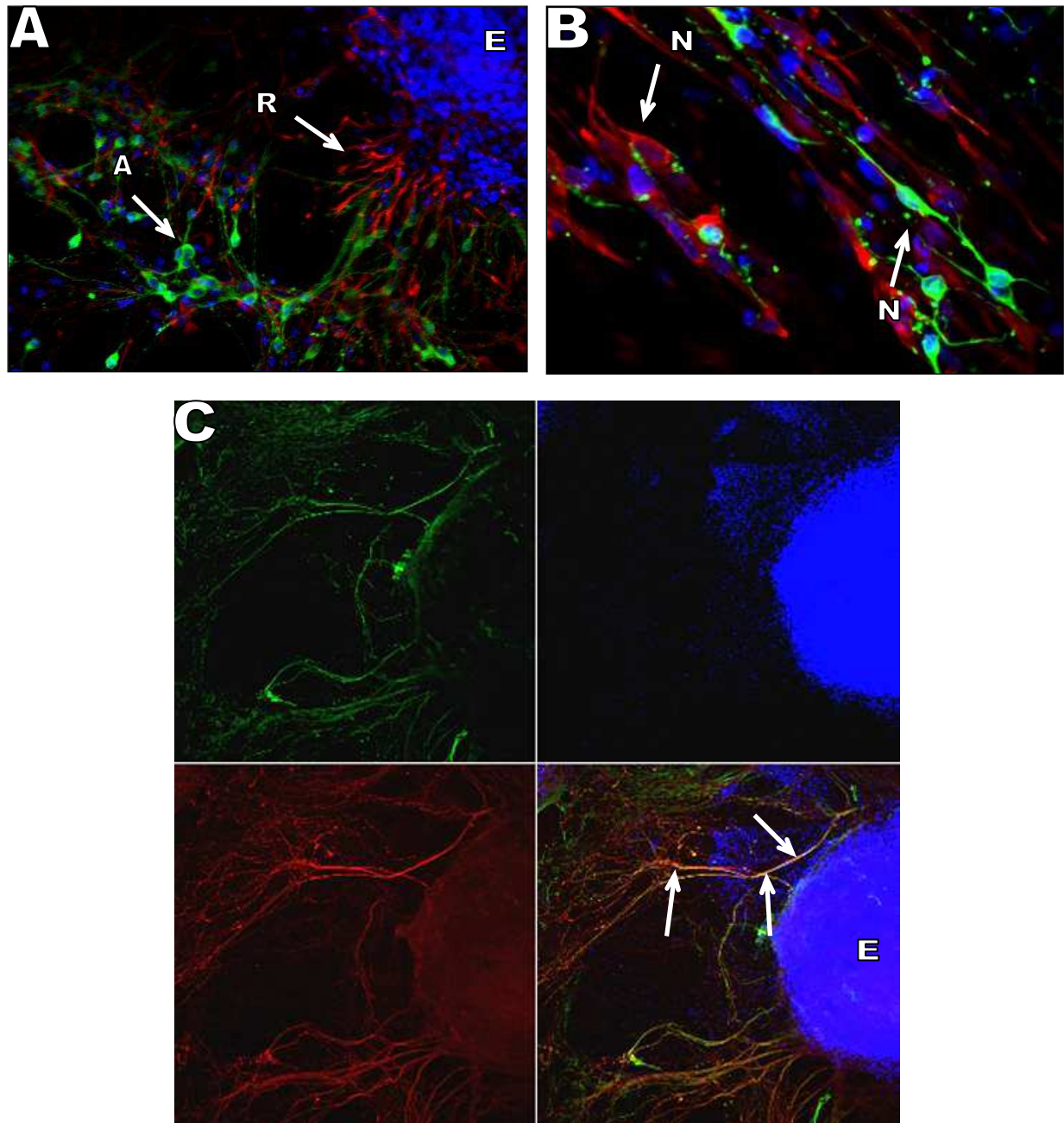


Abbildung 5-16: **A:** Ausplattiertes Embryoidkörperchen (E) nach Kultur in retinsäurehaltigem (5×10^{-7} mol/l) Differenzierungsmedium. Die Zellen der Randzone (R) sind überwiegend Nestin (rot) positiv, weiter außen liegende Zellen (A) sind $\beta 3$ -Tubulin (grün) positiv. Blau: Kernfärbung. **B:** Vergrößerte Ansicht der Peripherie des ausplattierten Embryoidkörperchens mit Zellen neuronaler Morphologie (N), die sich zum Teil Nestin (rot) positiv und zum Teil $\beta 3$ -Tubulin (grün) positiv darstellen. Blau: Kernfärbung. **C:** Embryoidkörperchen (E) nach Kultur in retinsäurehaltigem (5×10^{-7} mol/l) Differenzierungsmedium. Die Ausläufer der ausgebreiteten Zellen (Pfeile) zeigen sich NFL 68 positiv (rot) und $\beta 3$ -Tubulin positiv (grün), so dass sie den Neuronen zugeordnet wurden. Blau: Kernfärbung. Getrennte und überlappende Darstellung der Farbkanäle.

Mit Hilfe immunzytologischer Färbungen konnte der Einfluss unterschiedlicher FCS-Konzentrationen auf die neuronale Differenzierung, der bereits per Western Blot nachgewiesen wurde (siehe 5.2.2.2), bestätigt werden. Dazu wurden die Embryoidkörperchen 8 Tage mit 5% beziehungsweise 10% FCS bei gleicher Retinsäurekonzentration (5×10^{-7} mol/l) kultiviert und anschließend ausplattiert. Nach der immunzytologischen Färbung von Nestin wurde der Anteil an Embryoidkörperchen mit Nestin positiv gefärbten Zellen ausgezählt. Die Ergebnisse zeigten keine statistische Signifikanz ($p = 0,0548$), jedoch einen Trend dahingehend, dass die in 5% FCS kultivierten Embryoidkörperchen einen höheren Anteil an Nestin positiven Zellen aufwiesen (Abbildung 5-17).

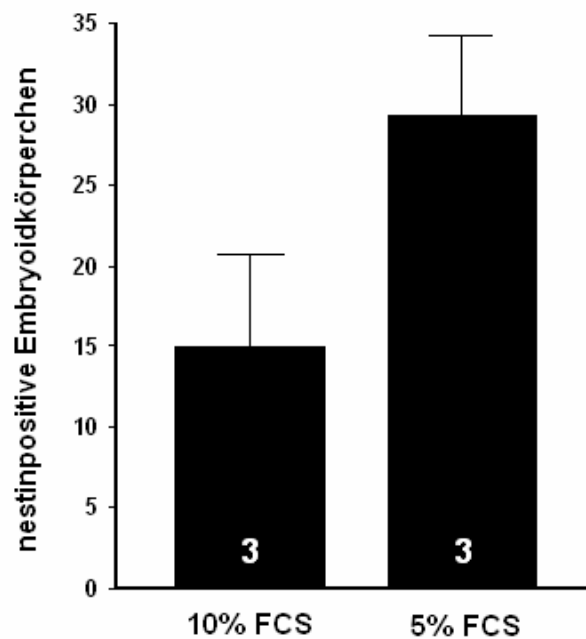


Abbildung 5-17: Anzahl der Embryoidkörperchen mit Nestin positiv gefärbten Zellen (Ordinate) in Abhängigkeit von der FCS-Konzentration während der Differenzierung (x-Achse). Die Zahl in den Balken entspricht der Anzahl der ausgewerteten Versuchsansätze.

5.5.1.2 Immunzytologische Charakterisierung der Zellen mit neuronenähnlicher Morphologie

Nach Anwendung des ITS-Selektionsmediums erfolgte die Vereinzelung und Ausplattierung der Zellen auf beschichteten Deckgläschen. Bereits 2 Tage nach Anheftung auf den Deckgläschen erwiesen sich sowohl die Zellkörper als auch die neu entstandenen Ausläufer der aus ES-Zellen differenzierten Zellen mit neuronaler Morphologie als β 3-Tubulin positiv. Bis zum 7. Tag nach Ausplattierung hatten die Ausläufer deutlich an Länge und an Verzweigungen gewonnen. Es zeigte sich eine noch ausgeprägtere Färbung von β 3-Tubulin. Es handelte sich um eine intrazelluläre Färbung filamentärer Strukturen über die ganze Zelle hinweg (Abbildung 5-18 A, D). Einzelne Ausläufer eines Neurons ließen sich zu diesem Zeitpunkt bereits mit Antikörpern gegen NFL 68 anfärben (Abbildung 5-18 B). Ebenso konnte MAP 2 in diesen Neuronen nachgewiesen werden. Die Färbung wurde zunächst über die gesamte Zelle hinweg nachgewiesen, so dass eine Unterscheidung der verschiedenen Ausläufer noch nicht möglich war. Das Färbemuster entsprach zu diesem Zeitpunkt dem von β 3-Tubulin, so dass eine überlappende Färbung beobachtet wurde (Abbildung 5-18 C, D). Bis zum Tag 21 nach Ausplattierung hatte sich das Färbemuster der Neurone dahingehend verändert, dass sich die Färbung von MAP 2 nun auf die Somata und einen Teil der Ausläufer beschränkte (Abbildung 5-18 E). Kombinationsfärbungen von β 3-Tubulin oder NFL 68 zusammen mit Färbungen von MAP 2 ermöglichten nun eine Unterscheidung verschiedener Ausläufer jeweils eines Neurons. MAP 2 gab in diesen älteren Neuronen einen Hinweis auf Dendriten (De Camilli et al. 1984, Tucker 1990, Riederer et al. 1995). NFL 68 beziehungsweise NFL 200 hingegen diente als Markerprotein für das Axon eines Neurons (Huneeus und Davison 1970, Nixon und Shea 1992). Überlappende Färbungen von MAP 2 und den Neurofilamenten traten in den älteren Neuronen (Tag 21) nicht auf. In diesen älteren Neuronen konnte allerdings Synaptophysin nachgewiesen werden, das durch ein punktförmiges Expressionsmuster über die gesamte Zelle gekennzeichnet war (Abbildung 5-18 F). Nestin als Markerprotein neuronaler Vorläuferzellen konnte in den hier aufgeführten Stadien der ausdifferenzierten Neurone mit den typischen langen Ausläufern nicht mehr nachgewiesen werden.

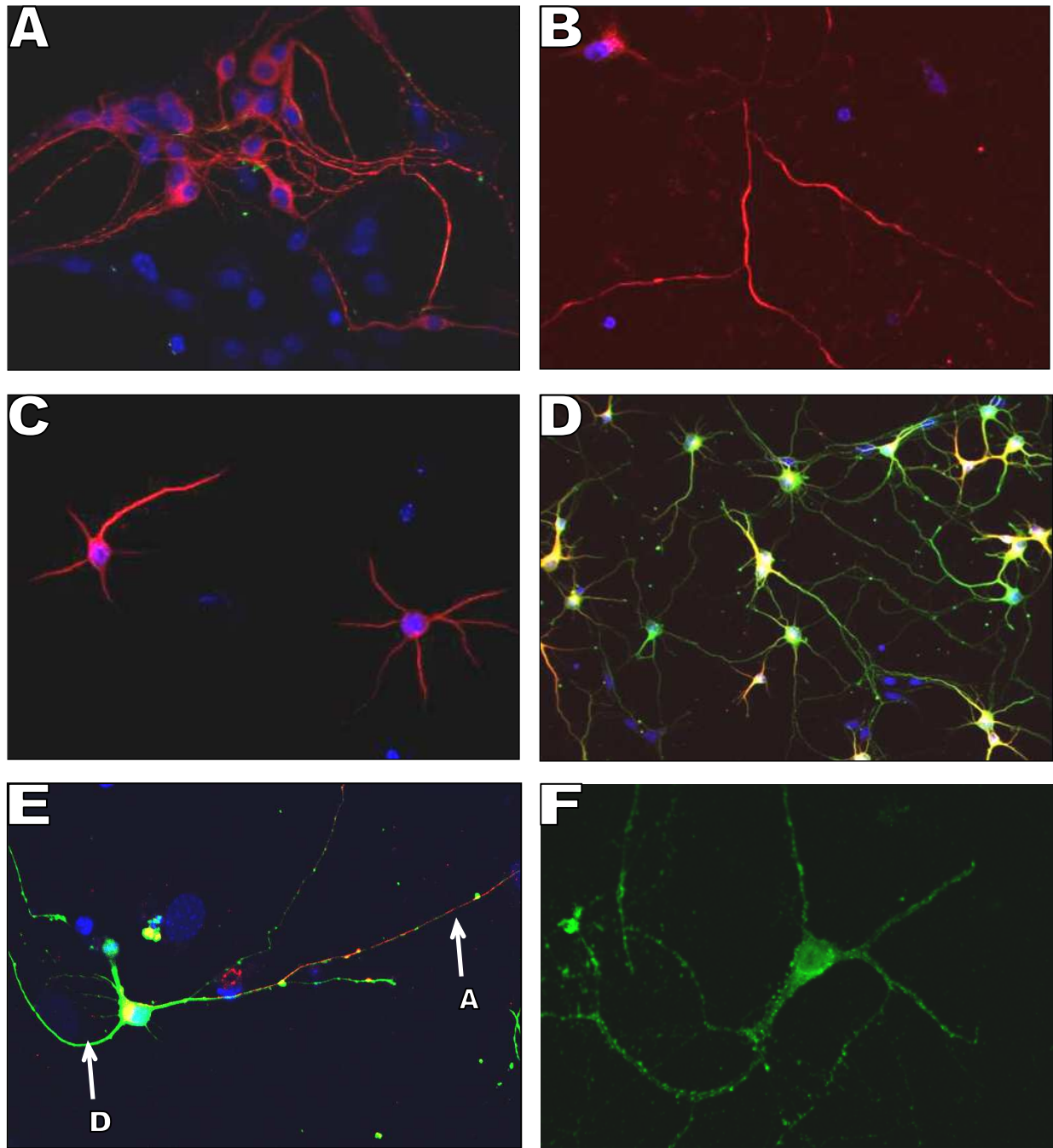


Abbildung 5-18: **A:** Neurone aus ES-Zellen mit $\beta 3$ -Tubulin (rot) positiven Ausläufern, Tag 7 nach Ausplattierung. Blau: Kernfärbung. **B:** Neurone aus ES-Zellen mit Nachweis von NFL 68 (rot), Tag 7 nach Ausplattierung. Blau: Kernfärbung. **C:** Neurone aus ES-Zellen mit Nachweis von MAP2 (rot) in den Dendriten, Tag 7 nach Ausplattierung. Blau: Kernfärbung. **D:** Neurone aus ES-Zellen, Tag 7 nach Ausplattierung. $\beta 3$ -Tubulin (grün) und MAP 2 (rot) sind über die ganze Zelle hinweg darstellbar. Blau: Kernfärbung. Der gelbe Farbeindruck entsteht durch Überlagerung von rotem und grünem Farbkanal. **E:** Neuron aus ES-Zellen mit getrennter Darstellung von MAP 2 (grün) positiven Dendriten (D) und NFL 68 (rot) positivem Axon (A), Tag 21 nach Ausplattierung. Blau: Kernfärbung. **F:** Neuron aus ES-Zellen mit Nachweis von Synaptophysin (grün), Tag 21 nach Ausplattierung.

Als Referenz für die immunzytologische Färbung wurden Primärneurone verwendet, die mit den gleichen Antikörpern wie die aus den ES-Zellen differenzierten Zellen behandelt wurden. Sie zeigten das gleiche Färbemuster wie die aus ES-Zellen hervorgegangenen Zellen und gaben dadurch einen Hinweis auf das tatsächliche Vorliegen eines neuronalen Phänotyps (Abbildung 5-19 A, B).

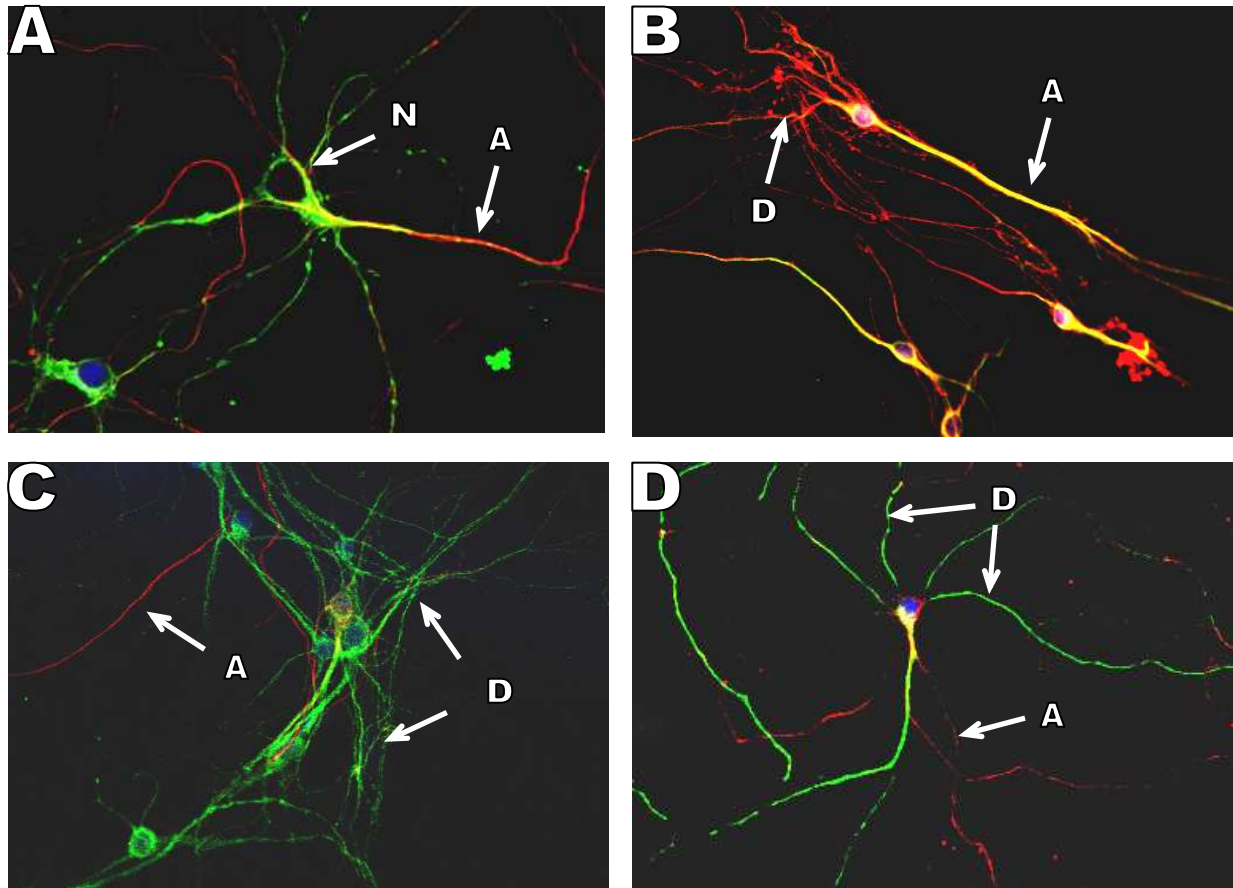


Abbildung 5-19: **A:** Primärneuron (N) mit Nachweis von NFL 68 (rot) im Axon (A) und β 3-Tubulin (grün) in der gesamten Zelle, Tag 30 nach Ausplattierung. Blau: Kernfärbung. **B:** Primärneurone mit Nachweis von β 3-Tubulin (rot) über die gesamten Zellen inklusive der Dendriten (D) und NFL 68 (grün) auf die jeweiligen Axone (A) beschränkt. Tag 30 nach Ausplattierung. Blau: Kernfärbung. Der gelbe Farbeindruck entsteht durch Überlagerung von rotem und grünem Farbkanal. **C:** Primärneurone mit getrennter Darstellung von NFL 68 (rot) positiven Axonen (A) und MAP 2 (grün) positiven Dendriten (D). Tag 30 nach Ausplattierung. Blau: Kernfärbung. **D:** Primärneuron mit getrennter Darstellung von NFL 200 (rot) positiven Axonen (A) und MAP 2 (grün) positiven Dendriten (D), Tag 30 nach Ausplattierung. Blau: Kernfärbung.

Neben den Zellen mit typischer neuronaler Morphologie waren sowohl unter den Primärneuronen als auch unter den aus ES-Zellen differenzierten Zellen weitere Zellen vorhanden, bei denen es sich offensichtlich nicht um Neurone handelte. Ein Teil der breitflächigeren Zellen wies eine GFAP positive Färbung auf und konnte damit den Gliazellen zugeordnet werden. Diese Zellen waren β 3-Tubulin negativ, ließen sich jedoch mit Antikörpern gegen Nestin anfärben (Abbildung 5-20 A, B, C). Im Gegensatz zu den Neuronen kam es bei den Gliazellen zu keinem Verlust der Nestinexpression bei fortschreitender Kulturdauer.

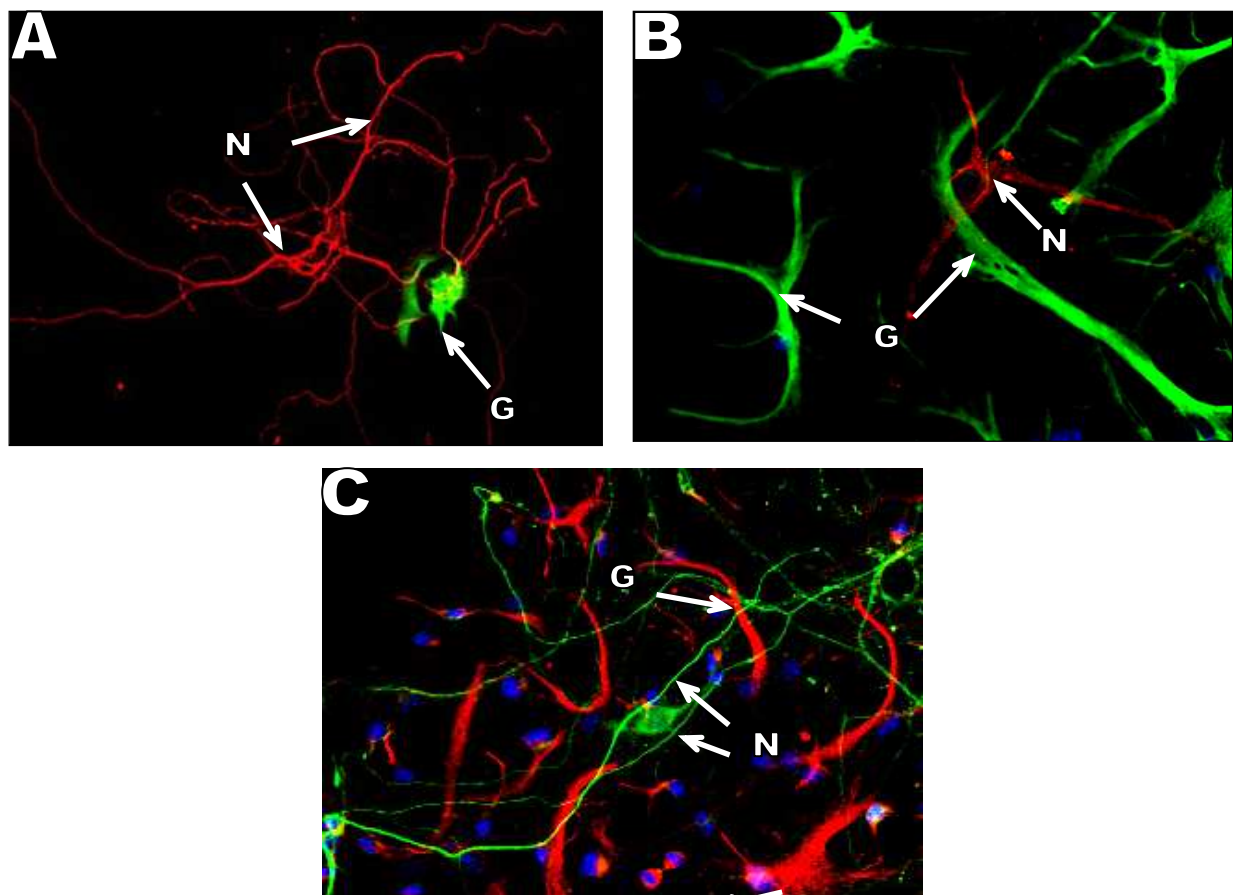


Abbildung 5-20: **A:** β 3-Tubulin (rot) positive Ausläufer von Neuronen (N) aus ES-Zellen und GFAP positive (grün) Gliazelle (G). Tag 14 nach Ausplattierung. **B:** β 3-Tubulin (rot) positives Primärneuron (N) und GFAP (grün) positive Gliazellen (G). Tag 30 nach Ausplattierung. Blau: Kernfärbung. **C:** β 3-Tubulin (grün) positive Primärneurone (N) und Nestin (rot) positive Gliazellen (G). Tag 30 nach Ausplattierung. Blau: Kernfärbung.

6 Diskussion

6.1 Kultur embryonaler Stammzellen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur neuronalen Differenzierung war es zunächst erforderlich, die embryonalen Stammzellen der Maus (ES-Zellen) im undifferenzierten Zustand zu vermehren. Es handelte sich dabei um ein Standardverfahren, das bereits im institutseigenen Labor etabliert war. Die verwendeten ES-Zellen des R1 Klon (Nagy et al. 1993) waren für die längerdauernde Expansion und gleichzeitige Beibehaltung des undifferenzierten Zustandes auf die Anwesenheit von embryonalen Mausfibroblasten (MEF-Zellen) angewiesen. Sie dienten den ES-Zellen als Ammenzellen (siehe 5.1). Eine wesentliche Funktion der MEF-Zellen besteht in der Sekretion von *leukaemia inhibitory factor* (LIF, Smith et al. 1988, Williams et al. 1988). Bei den MEF-Zellen handelt es sich jedoch um natürliche Produkte, die aus Tieren isoliert werden müssen. Dies kann dazu führen, dass sie beispielsweise durch unterschiedliche Herkunftstiere und unterschiedliche Passagezahlen natürliche Schwankungen ihrer Eigenschaften im Hinblick auf die Funktion als Ammenzellen und insbesondere auf die Fähigkeit der LIF-Sekretion aufweisen. Sinkt die Aktivität von LIF im Proliferationsmedium, bestünde die Gefahr einer vorzeitigen Ausdifferenzierung der ES-Zellen. Um dies zu vermeiden, wurde dem Nährmedium während der Proliferation exogen LIF hinzugefügt. Die LIF-Sekretion als eine wesentliche Funktion der MEF-Zellen wurde somit durch die exogene Zugabe von LIF ersetzt. Dies führte dazu, dass die ES-Zellen im Rahmen der Embryoidkörperchenbildung (Suspensionskultur, siehe 4.1.5.1) 2 Tage auch ohne MEF-Zellen, lediglich unter Zugabe von LIF im serumhaltigen Nährmedium, kultiviert werden konnten. Die Kultur ohne MEF-Zellen über diesen Zeitraum hinaus war jedoch nicht möglich. Offensichtlich kommt den MEF-Zellen eine über die Sekretion von LIF hinausgehende Bedeutung bei ihrer Funktion als Ammenzellen zu. Denkbar sind beispielsweise eine Erleichterung der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten bei der Ausbildung der ES-Zellkolonien oder die Sekretion weiterer Wachstumsfaktoren neben LIF, die für die Proliferation und das Überleben der ES-Zellen wichtig sind.

Für das Überleben und die Proliferation der ES-Zellen im undifferenzierten Zustand war zusätzlich zu den MEF-Zellen und LIF auch fetales Kälberserum (FCS) erforderlich. Nur unter Zugabe von FCS überlebten die ES-Zellen und es kam zur gewünschten Proliferation mit Ausbildung bohnenförmiger Kolonien undifferenzierter ES-Zellen. FCS ist ein Gemisch vieler Stoffe, das aus verschiedenen lebenden Tieren gewonnen wird, und unterliegt damit ähnlichen natürlichen Schwankungen wie sie bereits für die MEF-Zellen mit ihren unterschiedlichen Passagezahlen beschrieben wurden. Die Qualitätsschwankungen des FCS lassen sich reduzieren, indem man mit derselben FCS-Charge arbeitet, die wiederum in Vorexperimenten auf ihre Qualität und Wirksamkeit im Hinblick auf die Beibehaltung des undifferenzierten Zustandes der ES-Zellen überprüft werden muss (Tremml et al. 2008). Eine komplette Beseitigung der Qualitätsschwankungen ist jedoch nicht möglich.

Das Problem der hier durchgeführten Expansion der ES-Zellen unter Verwendung von MEF-Zellen und LIF ist, dass durch die Qualitätsschwankungen dieser tierischen Produkte eine Beeinflussung der späteren Differenzierung, beispielsweise durch eine vorzeitige Ausdifferenzierung, stattfindet. Um dieses Problem zu umgehen, müssten Kulturbedingungen für ES-Zellen geschaffen werden, die den Verzicht auf FCS und MEF-Zellen möglich machen. Die Schwierigkeit besteht darin, dass die nicht genau bekannten, aber dennoch essentiellen Funktionen dieser Produkte durch andere Substanzen übernommen werden müssen. Tatsächlich sind hierfür Lösungsmöglichkeiten in der Entwicklung. Vor einiger Zeit wurde eine neue chemische Verbindung namens „Pluripotin“ identifiziert, die wirkungsvoll die Proliferation embryonaler Stammzellen ohne Verlust der Pluripotenz induziert (Chen et al. 2006). Diese Verbindung macht die Co-Kultur mit MEF-Zellen und die Zugabe von FCS bei der Proliferation von ES-Zellen im undifferenzierten Zustand entbehrlich und sorgt für gleichbleibende Ausgangsbedingungen bei der späteren Differenzierung. Ein ähnlicher Effekt kann durch eine Kombination der beiden Wachstumsfaktoren LIF und *bone morphogenetic proteins* (BMPs) in genau bestimmten Konzentrationen erreicht werden. BMPs führen über eine spezifische Signalkaskade zur Expression der Id-Gene (Inhibitor of differentiation), die den undifferenzierten Zustand der ES-Zellen unabhängig von FCS und MEF-Zellen machen (Ying et al. 2003, Xu et al. 2008).

6.2 Neuronale Differenzierung

6.2.1 Bildung der Embryoidkörperchen

Nach der Proliferation der ES-Zellen im undifferenzierten Zustand wurde die komplette Entfernung sowohl des exogen zugegebenen LIF als auch der MEF-Zellen angestrebt. Dabei kam es zur Ausdifferenzierung der ES-Zellen. Unter nicht-adhärennten Wachstumsbedingungen ging dies einher mit der Bildung der Embryoidkörperchen (siehe 5.2.1). Für die Differenzierungsexperimente mit Retinsäure wurde der R1 Stammzellklon gewählt, da für diesen die Fähigkeit zur Bildung lebender Mäuse nachgewiesen war (Nagy et al. 1993) und dies Rückschlüsse auf dessen Pluripotenz zuließ. Darüber hinaus existierten für den R1 Klon bereits Protokolle zur neuronalen Differenzierung in vitro, so dass dessen Potential zur Bildung von Neuronen belegt war (Okabe et al. 1996, Gajovic et al. 1997, Lee et al. 2000).

Die Entfernung des Wachstumsfaktors LIF konnte problemlos durch einen oder mehrere Mediumwechsel erreicht werden. Die Entfernung der MEF-Zellen war hingegen komplizierter, aber dennoch unbedingt erforderlich. Dies zeigte sich darin, dass eine zu hohe Zahl an MEF-Zellen während der Bildung der Embryoidkörperchen zu fehlgeformten Embryoidkörperchen führte. Offensichtlich stören die MEF-Zellen die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten unter den sich differenzierenden ES-Zellen. Auch durch die Bildung geringer Mengen von LIF können die restlichen MEF-Zellen die Differenzierung beeinträchtigen, selbst wenn dies morphologisch nicht sichtbar ist. Durch zwischengeschaltete Sedimentationsschritte gemäß des Protokolls von Oyamada et al. (1996) wurde eine Trennung der restlichen MEF-Zellen von den ES-Zellen erreicht, so dass zumindest morphologisch regelmäßig runde Embryoidkörperchen hergestellt werden konnten (siehe 5.2.1). Von einer absoluten Reinheit der ES-Zellen konnte jedoch trotzdem nicht ausgegangen werden. Um diese zu erreichen, müssten die ES-Zellen von vorn herein komplett ohne MEF-Zellen als Ammenzellen kultiviert werden. Möglichkeiten hierfür wurden bereits unter 6.1 beschrieben. Darüber hinaus sind einige spezielle ES-Zellklone verfügbar, deren Expansion über längere Zeit ohne MEF-Zellen, lediglich unter Zugabe von LIF, möglich ist (Tremml et al. 2008). In wie weit sich

diese Eigenschaft jedoch auf die spätere Differenzierung, insbesondere auf die neuronale Differenzierung, auswirkt, muss kritisch untersucht werden.

6.2.2 Einfluss von Retinsäure auf die neuronale Differenzierung

Nach dem Entzug des Wachstumsfaktors LIF und der Entfernung der MEF-Zellen erfolgte die Differenzierung der ES-Zellen unter dem Einfluss von Retinsäure. Es wurden bereits mehrere Protokolle zur neuronalen Differenzierung von ES-Zellen unter Anwendung von Retinsäure publiziert, in denen jedoch mit unterschiedlichen Retinsäurekonzentrationen gearbeitet wurde. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Retinsäurekonzentrationen ausgetestet, die bereits zum Zwecke der neuronalen Differenzierung von ES-Zellen in anderen Arbeiten zur Anwendung kamen. Im Einzelnen war dies Retinsäure in einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l (Strubing et al. 1995) und 5×10^{-7} mol/l (Jones-Villeneuve et al. 1982, Bain et al. 1995). Die ebenfalls verwendete Konzentration von 5×10^{-8} mol/l wurde zwar schon von Fraichard et al. (1995) verwendet, erwies sich dort aber nicht als optimale Retinsäurekonzentration. Das Ausmaß der neuronalen Differenzierung wurde durch den Nachweis von Nestin, einem Markerprotein für gemeinsame neuronale und gliale Vorläuferzellen, mittels Western Blot quantifiziert. Unter der Annahme, dass die Konzentration an Nestin den Anteil an neuronalen Vorläuferzellen repräsentiert, zeigte sich beim Vergleich der drei Retinsäurekonzentrationen ein Maximum an neuronalen Vorläuferzellen bei einer Retinsäurekonzentration von 5×10^{-7} mol/l (siehe 5.2.2.1). Hier handelte es sich jedoch nur um einen Trend, ohne dass eine statistische Signifikanz festgestellt wurde. Um eine solche festzustellen, ist eine höhere Anzahl an Experimenten erforderlich. Ein statistisch aussagekräftiger Unterschied konnte hingegen beim Vergleich der Differenzierung unter Retinsäurezugabe mit der spontanen Differenzierung ohne Retinsäurezugabe ermittelt werden (siehe 5.2.2.1). Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Menge an neuronalen Vorläuferzellen unter Zugabe von Retinsäure (5×10^{-7} mol/l), so dass die Induktion der neuronalen Differenzierung durch Retinsäure nachgewiesen ist. Die Retinsäurekonzentration von 5×10^{-7} mol/l entspricht der von Jones-Villeneuve et al. (1982) und Bain et al. (1995) gewählten Konzentration. Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch ein anderer Stammzellklon und andere Kulturmethode angewandt

wurden, können zusätzliche Experimente mit weiter abgestuften Retinsäurekonzentrationen eine noch effektivere Konzentration für das Maximum der neuronalen Differenzierung unter den hier vorliegenden Kulturbedingungen liefern.

Durch die Analyse mehrerer Arbeiten zur Differenzierung von ES-Zellen mit Hilfe von Retinsäure zeigten Rohwedel et al. (1999), dass insbesondere bei Retinsäurezugabe während der ersten beiden Tage der Differenzierung eine selektive Induktion der neuronalen Differenzierung erfolgt. Eine länger als 2 Tage andauernde Kultur mit Retinsäure führt dagegen zur zusätzlichen Induktion von mesodermalen Zellen wie Fett- und Skelettmuskelzellen. Aus diesem Grund erfolgte die Induktion der neuronalen Differenzierung im Rahmen dieser Arbeit durch Zugabe von Retinsäure für zwei Tage unmittelbar nach Entzug von LIF. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Ergebnissen und den Beschreibungen von Rohwedel et al. (1999) ermittelten Bain et al (1995) jedoch einen anderen optimalen Zeitraum der Retinsäurezugabe. Dieser sieht die Zugabe der Retinsäure am vierten Tag der Embryoidkörperchenbildung für weitere 4 Tage vor (-4/+4 Protokoll). Diese Daten deuten darauf hin, dass auch andere Zeitpunkte der Retinsäurezugabe möglich sind. Es muss allerdings angemerkt werden, dass Bain et al. (1995) einen anderen Stammzellklon für ihre Differenzierungsexperimente verwendeten (D3 Klon), der ein anderes Verhalten gegenüber dem Retinsäureeinfluss zeigen kann als die Klone, die in die Analyse von Rohwedel et al. (1999) einbezogen wurden.

6.2.3 Einfluss von fetalem Kälberserum auf die neuronale Differenzierung

Die neuronale Differenzierung der ES-Zellen wurde zunächst im Differenzierungsmedium mit 10% FCS durchgeführt. In anderen Protokollen zur neuronalen Differenzierung, wie beispielsweise im Protokoll von Gajovic et al. (1997), wurde dagegen mit 1% FCS im Differenzierungsmedium gearbeitet. Auch die Selektion neuronaler Zellen wurde in einem serumfreien Medium durchgeführt (Okabe et al. 1996). Dies führte zu der Annahme, dass die neuronale Differenzierung durch serumarme Wachstumsbedingungen verbessert werden kann. Es wurde deshalb eine Reduktion der FCS-Konzentration von anfangs 10% auf 5%

durchgeführt. Die niedrigere FCS-Konzentration führte offensichtlich zu einem Mangelmilieu im Nährmedium, das in einer niedrigeren absoluten Zellzahl resultierte. Gleichzeitig konnte jedoch durch die Reduktion der FCS-Konzentration auf 5% eine signifikante Steigerung des Anteils an nestinpositiven neuronalen Vorläuferzellen erreicht werden, der anhand von Nestin mittels Western Blot quantifiziert wurde. Gleiches gilt für die Reduktion der FCS-Konzentration von 10% auf 2%, wobei erwartungsgemäß die absolute Zellzahl noch niedriger war. Der direkte Vergleich der FCS-Konzentrationen von 5% und 2% ergab jedoch einen niedrigeren Anteil an neuronalen Vorläuferzellen für die FCS-Konzentration von 2%, so dass eine weitere Reduktion nicht sinnvoll war (siehe 5.2.2.2). Diese Ergebnisse zeigen zwar, dass eine niedrigere FCS-Konzentration im Differenzierungsmedium zu einem höheren Anteil neuronaler Vorläuferzellen führt. Die von Gajovic et al. (1997) ermittelte optimale FCS-Konzentration von 1% war unter den hier vorliegenden Bedingungen jedoch nicht erreichbar. Vielmehr erwies sich eine FCS-Konzentration von 5% im Differenzierungsmedium als optimaler Kompromiss zwischen absoluter Zellzahl und dem Anteil Nestin positiver neuronaler Vorläuferzellen. Diese widersprüchlichen Ergebnisse können jedoch auch auf eine zu niedrige Zellzahl zurückzuführen sein, die durch das Mangelmilieu bei 2% FCS bedingt ist und keine aussagekräftigen Ergebnisse zulässt. Die günstige Wirkung einer geringeren FCS-Konzentration auf den Anteil neuronaler Vorläuferzellen könnte zum einen durch eine niedrigere Proliferationsrate neuronaler Vorläuferzellen erklärt werden. Sollte dies der Fall sein, hätten die langsam proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen einen Selektionsvorteil gegenüber schneller proliferierenden Zellen anderer Gewebe mit einem entsprechend höheren Nährstoffumsatz. Zum anderen führt eine geringere FCS-Konzentration zu einer geringeren Menge von unerwünschten und nicht erfassbaren Wachstumsfaktoren und Hormonen, die mit der Retinsäure konkurrieren könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden lediglich drei unterschiedliche FCS-Konzentrationen ausgetestet, so dass weitere Experimente mit feineren Abstufungen der FCS-Konzentrationen genauere Ergebnisse bezüglich der maximalen Menge an neuronalen Zellen liefern können.

6.2.4 Selektion neuronaler Zellen

Da es sich bei der hier beschriebenen gerichteten Differenzierung mittels Retinsäure um eine Methode handelt, die die komplexen physiologischen Vorgänge der neuronalen Entwicklung in vivo nicht annähernd imitieren kann, werden unter den entstandenen neuronalen Zellen immer auch andersartig differenzierte und undifferenzierte Zellen zu finden sein. Um die Reinheit der neuronalen Zellen zu erhöhen, müssen dem Vorgang der gerichteten Differenzierung Selektionsschritte nachgeschaltet werden, die gezielt Zellen des neuronalen Phänotyps isolieren. Die Bedeutung der Reinheit der Zellpopulation zeigt sich insbesondere im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung als Zellersatz. Anhand von Hepatozyten, die aus ES-Zellen differenziert und in die Leber von Mäusen transplantiert wurden, konnte gezeigt werden, dass aus den verbleibenden undifferenzierten Zellen Teratome hervorgehen können (Chinzei et al. 2002). Eine Bildung von Teratomen wurde ebenfalls nach Transplantation neuronaler Zellen in Mäusehirne beobachtet (Brüstle et al. 1997). Es ist somit wichtig, effektive Aufreinigungsverfahren für die aus ES-Zellen abgeleiteten Zelltypen zu finden, um undifferenzierte und andersartig differenzierte Zellen zu entfernen.

Möglichkeiten zur Anreicherung neuronaler Vorläuferzellen wurden bereits von Okabe et al. (1996) beschrieben. Diese verwendeten zur Selektion neuronaler Vorläuferzellen ein serumfreies Selektionsmedium, dem Insulin, Transferrin, Selenit und Fibronectin zugesetzt waren (ITSFn-Medium). Während FCS mit der unüberschaubaren Zahl an Inhaltsstoffen die Überlebensgrundlage für viele unterschiedliche Zellarten darstellt, sind für das Wachstum der neuronalen Vorläuferzellen lediglich diese vier Inhaltsstoffe entscheidend (Rizzino und Crowley 1980, Okabe et al. 1996, Brüstle et al. 1999). Ein solches ITSFn-Medium kam auch in dieser Arbeit in modifizierter Form (ITS-Medium) zum Einsatz. Auf den Zusatz von Fibronectin wurde aufgrund der von Okabe et al. (1996) beschriebenen geringen zusätzlich zu erwartenden Selektionswirkung verzichtet. Im Gegensatz zur Originalbeschreibung von Okabe et al. (1996), in der spontan aus ES-Zellen entstandene neuronale Vorläuferzellen selektiert wurden, wurde in dieser Arbeit zunächst eine gerichtete Differenzierung mittels Retinsäure vorangestellt. Erst danach erfolgte die mehrtätige Selektion durch das ITS-Medium, in dem

verbleibende nicht-neuronale Zellen, wie zum Beispiel Herzmuskelzellen, zu Grunde gingen (siehe 5.3). Die Zusatzstoffe des ITS-Mediums begünstigten zwar selektiv das Überleben der neuronalen Vorläuferzellen, da es sich aber auch für diese Zellen um ein Mangelmedium handelte, war die Kulturdauer nicht unbegrenzt ausdehnbar. Es musste vielmehr ein Kompromiss zwischen der Selektionswirkung und der verbleibenden Gesamtzellzahl gefunden werden. Während in der Originalarbeit von Okabe et al. (1996) ein Selektionszeitraum von 6 – 8 Tagen beschrieben wurde, erwies sich in den Versuchen dieser Arbeit eine Selektionszeit von 9 Tagen als optimal. Nach dieser Zeit zeigte sich anhand lichtmikroskopisch morphologischer Kriterien ein ausreichend hohes Verhältnis von potentiellen neuronalen Vorläuferzellen zu andersartig differenzierten Zellen bei noch ausreichender Zellzahl (siehe 5.3). Einschränkend muss bemerkt werden, dass nach der Selektion im ITS-Medium keine Quantifizierung der neuronalen Vorläuferzellen oder der daraus hervorgehenden Neurone erfolgte.

Eine absolute Reinheit der neuronalen Vorläuferzellen ist durch die Selektion im ITS-Medium nicht zu erwarten, da es sich um eine verhältnismäßig unspezifische Methode handelt und die Dauer des Selektionsvorganges nicht beliebig ausdehnbar ist. Darüber hinaus gehen aus den neuronalen Vorläuferzellen bei der weiteren Ausdifferenzierung sowohl Gliazellen als auch Neurone hervor, so dass auf dieser Ebene keine Selektion einer dieser beiden Zellarten erreicht werden kann. Anders als zur bloßen Anreicherung der gewünschten Zellart mit Hilfe des ITS-Mediums müssen zur Erzeugung hoch aufgereinigter Zellpopulationen aus einer Kultur unterschiedlich differenzierter Zellen präzisere Verfahren eingesetzt werden, die unter dem Begriff Zelllinienselektion (*lineage selection*, Schmandt et al. 2005) zusammengefasst werden können. Dabei werden Zellen eines exakt definierten Phänotyps anhand zellspezifischer Eigenschaften isoliert. Exprimieren die zu isolierenden Zellen ein spezifisches Markerprotein auf der Oberfläche, so können sie mittels immunologischer Selektionsmethoden, beispielsweise Immunopanning oder fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS), isoliert werden. Das Prinzip der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung beruht darauf, dass das spezifische Markerprotein mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper markiert wird. In einem speziellen Gerät wird durch einen Laserstrahl mit der geeigneten Wellenlänge der fluoreszierende Antikörper auf der markierten Zelle angeregt, das emittierte Licht

erkannt und die Zelle von den anderen abgetrennt. Bei der Technik des Immunopanning wird ähnlich wie bei der immunzytologischen Färbung das gesuchte Markerprotein mit einem Primärantikörper versehen. Der Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet, befindet sich jedoch fest verbunden auf dem Boden einer Petrischale, so dass die gewünschten Zellen am Schalenboden haften bleiben. Für diese immunologischen Techniken wurde das Oberflächenprotein *polysialic acid* – *neural cell adhesion molecule* (PSA-NCAM) als geeignetes Markerprotein zur Selektion neuronaler Zellen beschrieben. Neben dem Proteingerüst (NCAM) besteht es aus einer Kette von Kohlenhydraten (PSA) und gehört zur Superfamilie der Immunglobuline. PSA-NCAM wurde beispielsweise auf migrierenden Neuronen (O'Leary und Terashima 1988) oder beim Auswachsen der Axone des Tractus corticospinalis in das Rückenmark (Landmesser et al. 1988, Landmesser et al. 1990) nachgewiesen. Es dient den reifenden Neuronen bei der Ausbildung von Zellkontakten (Butler et al. 1997). Obwohl die Expression von PSA-NCAM auch auf den bipotenten Vorläuferzellen der Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) nachgewiesen wurde (Ben-Hur et al. 1998), konnte mittels Immunopanning beziehungsweise der FACS-Technik unter Verwendung des Oberflächenmarkerproteins PSA-NCAM Neuronenpopulationen mit einer Reinheit von 95% beziehungsweise 99,6% erreicht werden (Schmandt et al. 2005). Möglicherweise ist die präzise Selektion der Neurone darauf zurückzuführen, dass sich der Zeitpunkt der Expression von PSA-NCAM auf den unreifen neuronalen und glialen Zellen geringfügig unterscheidet und dieser Unterschied zur Selektion einer dieser beiden Zellarten genutzt werden kann.

6.2.5 Kultur der Neurone aus embryonalen Stammzellen

Es ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen, die aus den ES-Zellen differenzierten Neurone bis zu 38 Tage in vitro zu kultivieren (siehe 5.4). Dafür wurde auf bereits im institutseigenen Labor etablierte Methoden der Langzeitkultur von Neuronen zurückgegriffen. Diese beinhalteten die kontaktlose Co-Kultur der Neurone über Gliazellen. Die Neurone wurden dabei nach Anheftung auf den Deckgläschen in eine mit Gliazellen bewachsene Zellkulturschale überführt. Diese Wachstumsbedingungen erlauben die in-vitro-Kultur von Neuronen in geringer Dichte bei einer gleichzeitig

hohen Überlebensrate (Wang und Cynader 1999). Die Gliazellen erfüllen unter diesen Kulturbedingungen ihre Funktion als Ammenzellen, indem sie die Zusammensetzung des Nährmediums optimieren, beispielsweise durch die Regulation der Kaliumkonzentration, die Inaktivierung von Neurotransmittern und die Sekretion von Aminosäuren, Neuropeptiden und neurotrophen Faktoren (Martin 1992, Schmalenbach und Muller 1993, Wang und Cynader 1999). Durch seltene Mediumwechsel wurde versucht, das von den Gliazellen geschaffene Mikromilieu möglichst konstant zu halten. Ein Überwuchern der Gliazellen hätte vorzeitige Mediumwechsel und eine beeinträchtigte Ausbreitung der Neurone zur Folge gehabt, so dass diese vor Beginn der Co-Kultur mit Neuronen teilungsunfähig gemacht wurden.

Eine weitere Voraussetzung für das Überleben der Neurone war die feste Anheftung auf den Deckgläschen, die das Wachstum und die Ausbreitung der Zellausläufer ermöglichte. Die Anheftung wurde durch eine Poly-L-Lysinbeschichtung der Deckgläschen erreicht und in Übereinstimmung mit der Arbeit von Wang und Cynader (1999) durch Vorinkubation des Nährmediums über Gliazellen verbessert (siehe 5.4). Mit einer zusätzlich aufgetragenen Lamininbeschichtung nach Okabe et al. (1996) wurde die weitere Optimierung der Anheftung angestrebt. Laminin ist ein Protein der Extrazellulärmatrix. Es ist in allen Basallaminae zu finden, da es dort den Kontakt zu den Zellen vermittelt. Gleichzeitig hat Laminin die für diese Arbeit vorteilhafte Eigenschaft, dass es die Differenzierung von Neuronen induziert und die Ausreifung der neuronalen Ausläufer beschleunigt (Mruthyunjaya et al. 2010, Frade et al. 1996). Zu der bereits im institutseigenen Labor etablierten Methode der Neuronenlangzeitkultur gehörte weiterhin die Zugabe der neurotrophen Faktoren *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *nerve growth factor* (NGF) und *neurotrophin 3* (NT3). Diese Wachstumsfaktoren sind auch in vivo an der Differenzierung von Neuronen beteiligt und regulieren deren Wachstum (Cohen und Levi-Montalcini 1956, Barde et al. 1982, Maisonpierre et al. 1990, Mattson 2008). Die Kombination dieser Wachstumsfaktoren bei der Neuronenkultur im Rahmen dieser Arbeit führte zu einem längeren Überleben der Neurone und zu einem ausgeprägteren Wachstum der Ausläufer (siehe 5.4). Es wurde allerdings nicht geklärt, ob von diesen Wachstumsfaktoren ein Einfluss auf die Differenzierung ausging, beispielsweise dahingehend, dass nestinpositive gemeinsame gliale und

neuronale Vorläuferzellen zu einem höheren Anteil in postmitotische Neurone differenzieren. Dieser Einfluss wäre eher bei Laminin zu erwarten gewesen, da dieses zu einem früheren Zeitpunkt zum Einsatz kam als BDNF, NGF und NT3.

Die aus den ES-Zellen differenzierten neuronalen Vorläuferzellen beziehungsweise Neurone wurden nach Selektion im ITS-Medium zunächst in einem serumhaltigen Medium auf die beschichteten Deckgläschen ausplattiert (siehe 4.1.8.2; 4.1.8.3). Die Bedeutung des Serums scheint sich bei der Ausplattierung der aus ES-Zellen differenzierten Neurone allein auf den Vorgang der Anheftung zu beschränken (Wang und Cynader 1999), so dass es für die Langzeitkultur von Neuronen nicht unbedingt erforderlich ist. Dies spiegelt sich in mehreren Protokollen für die neuronale Primärkultur wieder, die entweder ganz oder zumindest nach der Ausplattierung der neuronalen Zellen ohne Zugabe von Serum auskommen (Romijn et al. 1984, Brewer et al. 1993, Pardo et al. 1997, Wang und Cynader 1999). Serum stellt zudem ein Gemisch zahlreicher unkontrollierbarer Inhaltsstoffe, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Hormone und Aminosäuren, dar (Brewer et al. 1993). Es ist damit eine der größten unbekannten Variablen in der Kultur der Neurone, die es so weit wie möglich zu eliminieren gilt, um konstante Wachstumsbedingungen zu erhalten. Der Ersatz des Serums beziehungsweise dessen identifizierte und für das neuronale Wachstum notwendigen Inhaltsstoffe kann durch Zugabe von B27-Supplement (Invitrogen, Karlsruhe) zum Nährmedium erreicht werden. Dies ist eine hochkonzentrierte Lösung, bei der im Unterschied zum Serum die Zusammensetzung und die Bedeutung der einzelnen Inhaltsstoffe genau bekannt ist (Brewer et al. 1993). In Anlehnung an das Protokoll von Okabe et al. (1996) und an die im institutseigenen Labor etablierte Methode der Neuronenkultur wurde jedoch bei der Neuronenkultur in dieser Arbeit trotz Zusatz von B27-Supplement nicht komplett auf die Zugabe von Serum verzichtet. Der Serumanteil wurde jedoch nach der Ausplattierung deutlich reduziert.

6.2.6 Charakterisierung der Neurone aus embryonalen Stammzellen

Die Expression des Zytoskelettproteins Nestin ist der erste immunzytologisch fassbare Schritt, der die Differenzierung in gemeinsame neuronale und gliale

Vorläuferzellen anzeigt. Aus diesen Vorläuferzellen gehen später sowohl die postmitotischen Neurone als auch die Astrozyten und Oligodendrozyten hervor (Frederiksen und McKay 1988, Lendahl et al. 1990, Gilyarov 2008). Nestin wurde in dieser Arbeit zur Identifikation neuronaler Vorläuferzellen und zur Quantifizierung der neuronalen Differenzierung verwendet (siehe 5.2.2.1; 5.2.2.2). Es handelt sich dabei um eine gängige Methode, die von mehreren Autoren angewendet wurde (Fraichard et al. 1995, Okabe et al. 1996, Lee et al. 2000, Kuo et al. 2003). Durch den immunologischen Nachweis von Nestin ließen sich die neu entstandenen neuronalen Vorläuferzellen selektiv darstellen (Immunzytologie) und die induktive Wirkung der Retinsäure auf deren Entstehung quantifizieren (Western Blot). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass Nestin auch in nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen werden kann. Dazu gehören Vorläuferzellen von Skelettmuskeln, Pankreasgang und -inseln sowie Leydig-Zellen (Sejersen und Lendahl 1993, Abraham et al. 2002, Davidoff et al. 2004). Im Gegensatz zu den Neuronen zeigten die Gliazellen keinen Verlust der Nestinexpression bei der Differenzierung aus den gemeinsamen Nestin positiven Vorläuferzellen (siehe 5.5.1.2). Die Unterscheidung von neuronalen Vorläuferzellen und Gliazellen war somit nur unter Hinzunahme morphologischer Kriterien und dem immunologischen Nachweis neuron- und gliazellspezifischer Markerproteine möglich, die aber erst im weiteren Verlauf der Differenzierung exprimiert wurden. Während Gliazellen immunzytologisch lediglich anhand von Nestin und *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) identifiziert wurden, standen für postmitotische Neurone mehrere Markerproteine zur Verfügung. Dazu gehören β 3-Tubulin, NFL 68, NFL 200, MAP 2 und Synaptophysin. Allerdings sind auch diese Marker nicht ausschließlich auf Neurone beschränkt. Beispielsweise wurde β 3-Tubulin als häufig verwendeter neuronaler Marker für den Übergang in den postmitotischen Zustand auch in Nagetierhoden, in fetalen neuroendokrinen Zellen, in retinalen Pigmentepithelzellen und in glialen Vorläuferzellen nachgewiesen (Katsetos et al. 2003). Die Färbung von β 3-Tubulin kann dennoch Hinweise auf das Vorliegen eines jungen Neurons geben, insbesondere wenn noch keine eindeutige Morphologie vorliegt. Einige der Markerproteine sind nicht in der gesamten Zelle nachweisbar und erlauben damit eine Unterscheidung der verschiedenen Neuronenstrukturen. In Übereinstimmung mit fremden Arbeiten (Huneeus und Davison 1970, Shaw et al. 1985, Nixon und Shea 1992) wurde NFL 68 und NFL 200 auch in dieser Arbeit in den aus ES-Zellen differenzierten Neuronen nachgewiesen

und kennzeichneten jeweils das Axon. Färbungen mit Antikörpern gegen MAP 2 waren zunächst nicht auf bestimmte Neuronenstrukturen begrenzt. Erst mit zunehmendem Alter der Neurone, im Falle dieser Arbeit mit 21 Tagen, beschränkte sich die Färbung auf die Somata und bestimmte Zellausläufer, die auf diese Weise als Dendriten identifiziert wurden (Caceres et al. 1984, De Camilli et al. 1984, Garner et al. 1988, Riederer et al. 1995). In diesem Stadium wurde keine gleichzeitige Färbung der Ausläufer mit Antikörpern gegen eines der Neurofilamente und MAP 2 beobachtet, so dass die funktionelle Trennung der Ausläufer in Dendriten und Axone bestätigt wurde. Die als Referenz verwendeten Primärneurone aus Mäusehirnen zeigten das gleiche Färbeverhalten wie die aus ES-Zellen differenzierten Zellen, wodurch der neuronale Phänotyp bestätigt wurde (siehe 5.5.1.2). Die in dieser Arbeit durchgeführten immunzytologischen Färbungen lieferten sehr deutliche Hinweise auf das Vorliegen eines neuronalen Phänotyps. Für den Beweis des Vorliegens eines neuronalen Phänotyps sind diese Untersuchungen jedoch nicht ausreichend. Hierfür sind zusätzliche Untersuchungen notwendig, beispielsweise elektrophysiologische Untersuchungen, die die zellspezifische Funktion des Neurons nachweisen.

6.2.7 Grenzen der Methode

Für vergleichende Untersuchungen von Neuronen verschiedener Stammzellklone und für Transplantationsexperimente kann es erforderlich sein, Neurone mit genau bekanntem und genau gleichem Alter zu gewinnen. Bei der hier durchgeführten zweitägigen Behandlung mit Retinsäure differenzierte ein Teil der ES-Zellen in neuronale Vorläuferzellen, die sich weiter in Neurone entwickelten. Der Zeitpunkt, an dem eine einzelne ES-Zelle die neuronale Differenzierungsrichtung einschlug, blieb unbekannt und variierte von Zelle zu Zelle. Es ist somit davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit erzeugten Neurone ein unterschiedliches Alter und einen uneinheitlichen Entwicklungsstand hatten (Du und Zhang 2004). Morphologie und Länge der Ausläufer geben nur grobe Hinweise auf das Alter der Neurone. Zur präziseren Altersbestimmung kann die Expression neuronaler Markerproteine herangezogen werden, die zu unterschiedlichen Zeiten nachzuweisen sind und bestimmte Entwicklungsphasen kennzeichnen (siehe 6.2.6). Hierfür müsste in Vorversuchen zunächst das zeitliche Expressionsmuster der verschiedenen

Antikörper untersucht werden. Durch geeignete Kombinationen mehrerer Antikörper gegen unterschiedliche Markerproteine kann dabei die Genauigkeit der Altersbestimmung erhöht werden. Eine Methode, die zu Neuronen gleichen und bekannten Alters bei der Differenzierung aus ES-Zellen führt, wurde bereits entdeckt und beschrieben. Eine solche Synchronisation des Entwicklungsstandes der Neurone kann mit Hilfe des Wachstumsfaktor FGF 2 erreicht werden, der die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen unter Zellkulturbedingungen induziert und gleichzeitig deren Ausdifferenzierung verhindert. Neuronale Vorläuferzellen werden dabei unter dem Einfluss von FGF 2 vermehrt, ohne dass sie sich ausdifferenzieren. Erst der plötzliche Entzug dieses Wachstumsfaktors führt zu einer gleichzeitigen Ausdifferenzierung aller neuronalen Vorläuferzellen, so dass die daraus hervorgehenden Neurone ein weitgehend ähnliches Alter haben und der Zeitpunkt der Ausdifferenzierung sich auf den Entzug von FGF 2 datieren lässt (Okabe et al. 1996, Brüstle et al. 1999, Du und Zhang 2004).

Native Neurone sind je nach Lokalisation und Funktion im Organismus durch eine charakteristische Konstellation von Ionenkanälen und Transmittern gekennzeichnet, die den Aufbau eines Ruhepotentials ermöglichen und Aktionspotentiale bei Kontakt mit dem für die Neuronenunterart spezifischen Transmitter an der Synapse auslösen. (Segal 1983, Hestrin 1993). Die in dieser Arbeit durchgeführten immunzytologischen Färbungen erlaubten zwar eine relativ sichere Identifizierung der aus ES-Zellen differenzierten Neurone, sie ließen jedoch keine Aussage zur Neuronenunterart und zur Funktionstüchtigkeit zu. Der Anteil der verschiedenen Neuronenunterarten blieb unbekannt. Es konnte ebenso nicht nachgewiesen werden, ob alle in vivo vorkommenden Neuronenunterarten durch die gerichtete Differenzierung mittels Retinsäure erzeugt werden können. Eine nähere Klassifikation der Neuronenunterarten und die Bestimmung der Funktionstüchtigkeit machen zusätzliche Untersuchungen erforderlich. Ähnlich wie bei isolierten nativen Neuronen ist es möglich, auch bei den aus ES-Zellen differenzierten Neuronen eine elektrophysiologische Aktivität als Beleg für deren Funktionstüchtigkeit nachzuweisen (Bain et al. 1995, Strubing et al. 1995, Okabe et al. 1996). Diese Untersuchungen erlauben gleichzeitig die Identifikation des Transmitters und damit die Zuordnung zur entsprechenden Neuronenunterart. Darüber hinaus ist es auch durch immunzytologische Färbungen möglich, Synapsen und Transmitter nachzuweisen

(Fletcher et al. 1991, Okabe et al. 1996, Svendsen et al. 2001). Die in dieser Arbeit durchgeführte Färbung von Synaptophysin lieferte Hinweise auf das Vorhandensein von Synapsen und damit auf eine Funktionsfähigkeit der Neurone.

Selbst wenn die Identifikation der genauen Neuronenunterarten gelingt, kann durch die alleinige Zugabe von Retinsäure während der Differenzierung von ES-Zellen immer noch kein Einfluss auf die Differenzierung in bestimmte Neuronenunterarten mit ihren unterschiedlichen Transmittern und Ionenkanalausstattungen ausgeübt werden. Neben der Reinheit der Neuronenkultur ist jedoch die Reinheit einer Neuronenunterart ein weiteres wichtiges Ziel. Um die Differenzierung in die Neuronenunterarten nicht dem Zufall zu überlassen, wurde versucht, spezielle Protokolle zu entwickeln, mit denen die Differenzierung in bestimmte Neuronenunterarten induziert werden kann. Beispielsweise konnte eine Erhöhung des Anteils dopaminerger Neurone durch eine Kombination der Wachstumsfaktoren *Sonic hedgehog* (SHH) und *fibroblast growth factor 8* (FGF8) sowie Ascorbinsäure im Nährmedium während der Differenzierung erreicht werden. Der Anteil dieser Neuronenunterart wurde damit auf bis zu 15,4% verdoppelt (Lee et al. 2000). Für die Induktion serotoninerger und GABAerger Neurone sowie Motoneurone sind ebenfalls Protokolle beschrieben, die sich einer Kombination unterschiedlicher Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Zeiträumen der Differenzierung bedienen (Barberi et al. 2003). Protokolle dieser Art ermöglichen die Erhöhung des Anteils einer Neuronenunterart. Noch eher als für die Differenzierung in Neurone im Allgemeinen gilt auch hier, dass ein Protokoll zur ausschließlichen Differenzierung oder zur vollständigen Selektion einer einzigen neuronalen Unterart bisher noch nicht beschrieben wurde.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Protokoll für die gerichtete in-vitro-Differenzierung embryonaler Stammzellen in neuronale Vorläuferzellen mit anschließender Differenzierung in postmitotische Neurone etabliert werden. Es wurde bestätigt, dass das Ausmaß der neuronalen Differenzierung sowohl von der Konzentration der Retinsäure als auch von der Konzentration des fetalen Kälberserums (FCS) während der Differenzierung abhängig ist. Die optimale Retinsäure- und FCS-Konzentration während der Differenzierung wurde ermittelt und bei der Zusammenstellung der Nährmedien berücksichtigt. Eine Kurzform des etablierten Protokolls ist im Anhang zu finden (siehe IV).

Die in-vitro-Kultur von Neuronen ist prinzipiell auch durch Isolation von Neuronen aus Mäusen beziehungsweise Mausembryonen zu erreichen (Primärneurone, siehe 4.1.8.4). Hierfür sind allerdings lebende Tiere erforderlich. Die in dieser Arbeit etablierte Methode stellt dagegen ein Instrument zur Verfügung, das die Gewinnung von Neuronen ermöglicht, ohne dass vorher ein lebendes Versuchstier vorhanden war. Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn aus embryonalen Stammzellen aufgrund einer schwerwiegenden Veränderung des Erbgutes keine lebensfähigen Mäuse erzeugt werden können. Mit Hilfe dieses Protokolls besteht dennoch die Möglichkeit, Neurone zu erzeugen und den Einfluss der genetischen Veränderung beispielsweise auf die Neurogenese oder die Funktion der Neurone zu untersuchen.

Weiter an Bedeutung gewinnt die hier etablierte Methode bei der Untersuchung genetischer Erkrankungen, die mit einer hohen Heterogenität der genetischen Veränderungen einhergehen. Als Beispiel sind an dieser Stelle die hereditären spastischen Spinalparalysen (HSP) zu nennen, neurodegenerative Erkrankungen, bei denen es im Verlauf der Krankheit zum Untergang des ersten Motoneurons im Rückenmark kommt. Der Krankheit liegen zahlreiche verschiedene Mutationen zu Grunde, die zu dem typischen Krankheitsbild führen (Reid 2003, Schüle et al. 2009). Zu Forschungszwecken sind bereits zahlreiche embryonale Mausstammzellklone im Handel verfügbar, in die diese verschiedenen Mutationen eingebracht wurden. Um

die zur Erkrankung führende Fehlfunktion der Neurone zu untersuchen, müssten aufgrund der Heterogenität zahlreiche lebende Mäuse in einem aufwändigen Verfahren erzeugt werden, um daraus Neurone zu isolieren. Die hier etablierte Methode bietet jedoch die Möglichkeit, diesen Schritt zu umgehen, indem die Neurone mit verhältnismäßig geringerem Aufwand erzeugt werden können und so trotzdem einer Untersuchung zugänglich werden.

III. Literatur- und Quellenverzeichnis

Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF. 2002. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 143(8): 3152-61.

Andrews PW. 2002. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357(1420): 405-17.

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168(2): 342-57.

Barde YA, Edgar D, Thoenen H. 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* 1(5): 549-53.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114(6): 763-76.

Ben-Hur T, Rogister B, Murray K, Rougon G, Dubois-Dalcq M. 1998. Growth and fate of PSA-NCAM⁺ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci* 18(15): 5777-88.

Bertrand V, Hudson C, Caillol D, Popovici C, Lemaire P. 2003. Neural tissue in ascidian embryos is induced by FGF9/16/20, acting via a combination of maternal GATA and Ets transcription factors. *Cell* 115(5): 615-27.

Boncinelli E, Simeone A, Acampora D, Mavilio F. 1991. HOX gene activation by retinoic acid. *Trends Genet* 7(10): 329-34.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.

Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309(5965): 255-6.

Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35(5): 567-76.

Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD. 1999. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285(5428): 754-6.

Brüstle O, Spiro AC, Karram K, Choudhary K, Okabe S, McKay RD. 1997. In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26): 14809-14.

Butler AK, Uryu K, Morehouse V, Rougon G, Chesselet MF. 1997. Regulation of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum: effects of cortical lesions. *J Comp Neurol* 389(2): 289-308.

Caccamo D, Katsetos CD, Herman MM, Frankfurter A, Collins VP, Rubinstein LJ. 1989. Immunohistochemistry of a spontaneous murine ovarian teratoma with neuroepithelial differentiation. Neuron-associated beta-tubulin as a marker for primitive neuroepithelium. *Lab Invest* 60(3): 390-8.

Caceres A, Banker G, Steward O, Binder L, Payne M. 1984. MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res* 315(2): 314-8.

Chambers I, Smith A. 2004. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* 23(43): 7150-60.

Chen H, Namkung MJ, Juchau MR. 1995. Biotransformation of all-trans-retinol and all-trans-retinal to all-trans-retinoic acid in rat conceptal homogenates. *Biochem Pharmacol* 50(8): 1257-64.

Chen S, Do JT, Zhang Q, Yao S, Yan F, Peters EC, Scholer HR, Schultz PG, Ding S. 2006. Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(46): 17266-71.

Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Aii S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H. 2002. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 36(1): 22-9.

Cohen S, Levi-Montalcini R. 1956. A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Snake Venom. *Proc Natl Acad Sci U S A* 42(9): 571-4.

Cohlan SQ. 1953. Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117(3046): 535-6.

Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G. 1997. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 110 (Pt 11): 1279-85.

Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Muller D. 2004. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol* 167(5): 935-44.

De Camilli P, Miller PE, Navone F, Theurkauf WE, Vallee RB. 1984. Distribution of microtubule-associated protein 2 in the nervous system of the rat studied by immunofluorescence. *Neuroscience* 11(4): 817-46.

Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Morano I, Luft FC, Wobus AM. 1997. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *Faseb J* 11(11): 905-15.

Du ZW, Zhang SC. 2004. Neural differentiation from embryonic stem cells: which way? *Stem Cells Dev* 13(4): 372-81.

Duester G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 267(14): 4315-24.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4(11): 1313-7.

Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819): 154-6.

Fassler R, Meyer M. 1995. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* 9(15): 1896-908.

Fassler R, Rohwedel J, Maltsev V, Bloch W, Lentini S, Guan K, Gullberg D, Hescheler J, Addicks K, Wobus AM. 1996. Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *J Cell Sci* 109 (Pt 13): 2989-99.

Finch BW, Ephrussi B. 1967. Retention of multiple developmental potentialities by cells of a mouse testicular teratocarcinoma during prolonged culture in vitro and their extinction upon hybridization with cells of permanent lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57(3): 615-621.

Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G. 1991. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci* 11(6): 1617-26.

Frade JM, Martinez-Morales JR, Rodriguez-Tebar A. 1996. Laminin-1 selectively stimulates neuron generation from cultured retinal neuroepithelial cells. *Exp Cell Res* 222(1): 140-9.

Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 108 (Pt 10): 3181-8.

Frederiksen K, McKay RD. 1988. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci* 8(4): 1144-51.

Friedrich G, Soriano P. 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 5(9): 1513-23.

Gajovic S, St-Onge L, Yokota Y, Gruss P. 1997. Retinoic acid mediates Pax6 expression during in vitro differentiation of embryonic stem cells. *Differentiation* 62(4): 187-92.

Garner CC, Brugg B, Matus A. 1988. A 70-kilodalton microtubule-associated protein (MAP2c), related to MAP2. *J Neurochem* 50(2): 609-15.

Gilyarov AV. 2008. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol* 38(2): 165-9.

Hestrin S. 1993. Different glutamate receptor channels mediate fast excitatory synaptic currents in inhibitory and excitatory cortical neurons. *Neuron* 11(6): 1083-91.

Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpisz M, Schulze-Osthoff K, Mackiewicz A, Los M. 2008. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med* 86(12): 1301-14.

Huneeus FC, Davison PF. 1970. Fibrillar proteins from squid axons. I. Neurofilament protein. *J Mol Biol* 52(3): 415-28.

Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein H, Dolle P, Renucci A, Duboule D. 1991. Murine genes related to the *Drosophila* AbdB homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *Embo J* 10(8): 2279-89.

Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI. 1982. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J Cell Biol* 94(2): 253-62.

Katsetos CD, Herman MM, Mork SJ. 2003. Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* 55(2): 77-96.

Kessel M, Gruss P. 1991. Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. *Cell* 67(1): 89-104.

Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. 2002. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418(6893): 50-6.

Kindler V. 2005. Postnatal stem cell survival: does the niche, a rare harbor where to resist the ebb tide of differentiation, also provide lineage-specific instructions? *J Leukoc Biol* 78(4): 836-44.

Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. 1996. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98(1): 216-24.

Kochhar DM. 1973. Limb development in mouse embryos. I. Analysis of teratogenic effects of retinoic acid. *Teratology* 7(3): 289-95.

Krumlauf R. 1994. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78(2): 191-201.

Kuo HC, Pau KY, Yeoman RR, Mitalipov SM, Okano H, Wolf DP. 2003. Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages. *Biol Reprod* 68(5): 1727-35.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.

Landmesser L, Dahm L, Schultz K, Rutishauser U. 1988. Distinct roles for adhesion molecules during innervation of embryonic chick muscle. *Dev Biol* 130(2): 645-70.

Landmesser L, Dahm L, Tang JC, Rutishauser U. 1990. Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron* 4(5): 655-67.

Langman J, Welch GW. 1966. Effect of vitamin a on development of the central nervous system. *J Comp Neurol* 128(1): 1-16.

Langston AW, Gudas LJ. 1992. Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mech Dev* 38(3): 217-27.

Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. 2000. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18(6): 675-9.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. 1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4): 585-95.

Liu N, Lu M, Tian X, Han Z. 2007. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 211(2): 279-86.

Maden M. 2001. Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol* 209: 1-77.

Maden M. 2002. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3(11): 843-53.

Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. 1990. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247(4949 Pt 1): 1446-51.

Martin DL. 1992. Synthesis and release of neuroactive substances by glial cells. *Glia* 5(2): 81-94.

Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(12): 7634-8.

Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. 1999. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* 18(15): 4261-9.

Mattson MP. 2008. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144: 97-112.

Mavilio F, Simeone A, Boncinelli E, Andrews PW. 1988. Activation of four homeobox gene clusters in human embryonal carcinoma cells induced to differentiate by retinoic acid. *Differentiation* 37(1): 73-9.

McCaffery P, Drager UC. 1994. Hot spots of retinoic acid synthesis in the developing spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(15): 7194-7.

Mimeault M, Hauke R, Batra SK. 2007. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther* 82(3): 252-64.

Mruthyunjaya S, Manchanda R, Godbole R, Pujari R, Shiras A, Shastry P. Laminin-1 induces neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells in serum/differentiation

factors-free conditions through activation of FAK-MEK/ERK signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1): 43-8.

Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18): 8424-8.

Niwa H. 2001. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26(3): 137-48.

Nixon RA, Shea TB. 1992. Dynamics of neuronal intermediate filaments: a developmental perspective. *Cell Motil Cytoskeleton* 22(2): 81-91.

Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD. 1996. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 59(1): 89-102.

O'Leary DD, Terashima T. 1988. Cortical axons branch to multiple subcortical targets by interstitial axon budding: implications for target recognition and "waiting periods". *Neuron* 1(10): 901-10.

Oyamada Y, Komatsu K, Kimura H, Mori M, Oyamada M. 1996. Differential regulation of gap junction protein (connexin) genes during cardiomyocytic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Exp Cell Res* 229(2): 318-26.

Papalopulu N, Lovell-Badge R, Krumlauf R. 1991. The expression of murine Hox-2 genes is dependent on the differentiation pathway and displays a collinear sensitivity to retinoic acid in F9 cells and *Xenopus* embryos. *Nucleic Acids Res* 19(20): 5497-506.

Pardo B, Paino CL, Casarejos MJ, Mena MA. 1997. Neuronal-enriched cultures from embryonic rat ventral mesencephalon for pharmacological studies of dopamine neurons. *Brain Res Brain Res Protoc* 1(2): 127-32.

Popperl H, Featherstone MS. 1993. Identification of a retinoic acid response element upstream of the murine Hox-4.2 gene. *Mol Cell Biol* 13(1): 257-65.

Reid E. 2003. Many pathways lead to hereditary spastic paraplegia. *Lancet Neurol* 2(4): 210.

Riederer BM, Draberova E, Viklicky V, Draber P. 1995. Changes of MAP2 phosphorylation during brain development. *J Histochem Cytochem* 43(12): 1269-84.

Rizzino A, Crowley C. 1980. Growth and differentiation of embryonal carcinoma cell line F9 in defined media. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(1): 457-61.

Rohdewohld H, Wobus AM. 2002. Embryonale Stammzellen der Maus - Eigenschaften, Potential und Verwendung. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 45(12): 113-122.

Rohwedel J, Guan K, Wobus AM. 1999. Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* 165(3-4): 190-202.

Rohwedel J, Guan K, Zuschmitter W, Jin S, Ahnert-Hilger G, Furst D, Fassler R, Wobus AM. 1998. Loss of beta1 integrin function results in a retardation of myogenic, but an acceleration of neuronal, differentiation of embryonic stem cells in vitro. *Dev Biol* 201(2): 167-84.

Romijn HJ, van Huizen F, Wolters PS. 1984. Towards an improved serum-free, chemically defined medium for long-term culturing of cerebral cortex tissue. *Neurosci Biobehav Rev* 8(3): 301-34.

Schmalenbach C, Muller HW. 1993. Astroglia-neuron interactions that promote long-term neuronal survival. *J Chem Neuroanat* 6(4): 229-37.

Schmandt T, Meents E, Gossrau G, Gornik V, Okabe S, Brustle O. 2005. High-purity lineage selection of embryonic stem cell-derived neurons. *Stem Cells Dev* 14(1): 55-64.

Schüle R, Bonin M, Durr A, Forlani S, Sperfeld AD, Klimpe S, Mueller JC, Seibel A, van de Warrenburg BP, Bauer P, Schols L. 2009. Autosomal dominant spastic paraplegia with peripheral neuropathy maps to chr12q23-24. *Neurology* 72(22): 1893-8.

Scott MP, Weiner AJ. 1984. Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(13): 4115-9.

Segal M. 1983. Rat hippocampal neurons in culture: responses to electrical and chemical stimuli. *J Neurophysiol* 50(6): 1249-64.

Sejersen T, Lendahl U. 1993. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci* 106 (Pt 4): 1291-300.

Shaw G, Banker GA, Weber K. 1985. An immunofluorescence study of neurofilament protein expression by developing hippocampal neurons in tissue culture. *Eur J Cell Biol* 39(1): 205-16.

Shum AS, Poon LL, Tang WW, Koide T, Chan BW, Leung YC, Shiroishi T, Copp AJ. 1999. Retinoic acid induces down-regulation of Wnt-3a, apoptosis and diversion of tail bud cells to a neural fate in the mouse embryo. *Mech Dev* 84(1-2): 17-30.

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336(6200): 688-90.

Solter D, Skreb N, Damjanov I. 1970. Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature* 227(5257): 503-4.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241(4861): 58-62.

Stanworth SJ, Newland AC. 2001. Stem cells: progress in research and edging towards the clinical setting. *Clin Med* 1(5): 378-82.

Strubing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM. 1995. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev* 53(2): 275-87.

Svendsen CN, Bhattacharyya A, Tai YT. 2001. Neurons from stem cells: preventing an identity crisis. *Nat Rev Neurosci* 2(11): 831-4.

Swartzendruber DE, Cram LS, Lehman JM. 1976. Microfluoremetric analysis of DNA content changes in murine teratocarcinoma. *Cancer Res* 36(6): 1894-9.

Thomas KR, Capecchi MR. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51(3): 503-12.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391): 1145-7.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17): 7844-8.

Tibbles L, Wiley MJ. 1988. A comparative study of the effects of retinoic acid given during the critical period for inducing spina bifida in mice and hamsters. *Teratology* 37(2): 113-25.

Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. 1984. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem* 259(17): 10978-82.

Tremml G, Singer M, Malavarca R. 2008. Culture of mouse embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 1: Unit 1C 4.

Tucker RP. 1990. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Brain Res Rev* 15(2): 101-20.

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F. 2004. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26(4): 445-53.

Wagers AJ, Weissman IL. 2004. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116(5): 639-48.

Wang XF, Cynader MS. 1999. Effects of astrocytes on neuronal attachment and survival shown in a serum-free co-culture system. *Brain Res Brain Res Protoc* 4(2): 209-16.

Wiedenmann B, Franke WW. 1985. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41(3): 1017-28.

Williams JB, Napoli JL. 1985. Metabolism of retinoic acid and retinol during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(14): 4658-62.

Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336(6200): 684-7.

Wilson SI, Edlund T. 2001. Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* 4 Suppl: 1161-8.

Wilson SI, Graziano E, Harland R, Jessell TM, Edlund T. 2000. An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol* 10(8): 421-9.

Wilson SI, Rydstrom A, Trimborn T, Willert K, Nusse R, Jessell TM, Edlund T. 2001. The status of Wnt signalling regulates neural and epidermal fates in the chick embryo. *Nature* 411(6835): 325-30.

Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM. 1997. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29(6): 1525-39.

Xu Y, Shi Y, Ding S. 2008. A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. *Nature* 453(7193): 338-44.

Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115(3): 281-92.

IV. Kurzform des etablierten Protokolls

1. Proliferation der embryonalen Stammzellen im undifferenzierten Zustand mit Hilfe von embryonalen Mausfibroblasten und *leukaemia inhibitory factor* (LIF) bis zur gewünschten Zellmenge (siehe 4.1.3).
2. Ablösen und Vereinzeln der Zellen mit Trypsin/EDTA 0,25%. Anschließend Zentrifugation (1000 U/min, 3min) und erneute Resuspension (siehe 4.1.1.2).
3. Trennung der embryonalen Stammzellen von den embryonalen Mausfibroblasten mit Hilfe zweier Sedimentationsschritte (siehe 4.1.4)
4. Bildung der Embryoidkörperchen in Suspensionskultur (siehe 4.1.5.1) oder in hängenden Tropfen (siehe 4.1.5.2).

Für die Bildung der Embryoidkörperchen in Suspensionskultur ist zunächst eine zweitägige Anzucht der embryonalen Stammzellen auf gelatinebeschichteten Zellkulturschalen erforderlich, die bei der Kultur in hängenden Tropfen entfällt.

Die Bildung der Embryoidkörperchen erfolgt bei beiden Verfahren im Differenzierungsmedium mit 5% fetalem Kälberserum für insgesamt 8 Tage. Dem Differenzierungsmedium wird während der ersten beiden Tage Retinsäure in einer Konzentration von 5×10^{-7} mol/l hinzugefügt (siehe 4.1.5.1).

5. Ausplattierung der 8 Tage alten Embryoidkörperchen auf gelatinebeschichteten Zellkulturschalen (4.1.6).
6. Selektion neuronaler Vorläuferzellen. Hierfür wird nach 24 Stunden das Differenzierungsmedium der inzwischen angehefteten Embryoidkörperchen durch ITS-Selektionsmedium ersetzt. Die Selektionsdauer beträgt 9 Tage bei täglichem Mediumwechsel (siehe 4.1.7).

7. Ablösen der verbliebenen Zellen mit Trypsinlösung 0,1%. Nach Zentrifugation (1000 U/min, 10 min) wird das Zellpellet in N3-Medium mit 0,1% DNase resuspendiert und die Zellen vollständig vereinzelt. Entfernung restlicher Zellkonglomerate durch ein Mikrosieb mit der Porengröße 70 µm. Die Zellen werden erneut zentrifugiert und in N3-Medium mit 5% Pferdeserum resuspendiert (siehe 4.1.8.2).
8. Ausplattierung der selektierten und vereinzelteten Zellen auf Poly-L-Lysin- und lamininbeschichtete Deckgläschen. Für die Gliazell-Co-Kultur werden diese zusätzlich mit 3 Paraffinpunkten als Abstandhalter versehen (siehe 4.1.8.1). Die Ausplattierung erfolgt im N3-Medium mit 5% Pferdeserum (siehe 4.1.8.2).
9. Austausch des N3-Mediums mit 5% Pferdeserum gegen N3-Medium mit 1% Pferdeserum am Folgetag. Die für die Langzeitkultur vorgesehenen Deckgläschen mit Paraffinpunkten werden in gliazellbewachsene Zellkulturschalen, die mit N3-Medium mit 1% Pferdeserum befüllt sind, überführt (siehe 4.1.8.3). Dem Medium werden die neurotrophen Faktoren BDNF, NGF und NT3 hinzugefügt (10 ng/ml; siehe 4.1.8.2). Der Mediumwechsel erfolgt alle 3-5 Tage wobei nur ein Drittel des Mediums ersetzt wird.

V. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Deufel für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Gutachtens trotz seiner Tätigkeit in der Landesregierung Thüringens.

Des Weiteren möchte ich Dr. Christian Beetz und vor allem Dr. Torsten Pamminer vom Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik für die Betreuung und die Unterstützung beim Erstellen der Dissertation danken. Mein Dank gilt außerdem allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für das mehrfache Korrekturlesen der Dissertation danke ich meinen Eltern, meiner Schwester Sonja und insbesondere meinem Mitbewohner André Meyer.

Meinen Jenaer und Bietigheimer Freunden, meinen Mitbewohnern und meiner Familie danke ich für die seelische Unterstützung, die nicht zuletzt wegen dieser Dissertation hin und wieder erforderlich war.

Abschließend möchte ich an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen und mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht haben und ich mit ihrer Unterstützung rechnen durfte und darf, wann immer ich sie brauchte und brauche.

VI. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. T. Deufel und Dr. T. Pamminger vom Instituts für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Uniklinikum Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Unterschrift des Verfassers

VII. Lebenslauf

Name: Philipp Alexander Theurer

Geburtsdatum: 1. August 1982

Geburtsort: Ludwigsburg, Baden-Württemberg

Familienstand: ledig

Schulbesuche:

1989-1993 Grundschule Weimarer Weg, Bietigheim-Bissingen

1993-2002 Gymnasium im Ellental, Bietigheim-Bissingen

Abitur im Juni 2002

Zivildienst

2002-2003 Deutsches Rotes Kreuz Ludwigsburg

Bereich Rettungsdienst und Krankentransport

Studium

2003-2009 Studium der Humanmedizin an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)
im September 2005

Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Staatsexamen)
im Dezember 2009

Approbation als Arzt im Januar 2010

Seit Februar 2010 Beschäftigung an der Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin
am Universitätsklinikum Jena

Jena, den

Unterschrift